

**Synthese und Klonierung der cDNA
eines für *Pseudomonas aeruginosa* spezifischen monoklonalen Antikörpers
und Charakterisierung seiner Expression in
*Saccharomyces cerevisiae***

Matthias Marget

Disbui. München

1988



Dissertation der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Synthese und Klonierung der cDNA
eines für *Pseudomonas aeruginosa* spezifischen monoklonalen Antikörpers
und Charakterisierung seiner Expression in
Saccharomyces cerevisiae

von

Matthias Marget

aus

Freiburg im Breisgau

1988

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von Paragraph 12 (3) der Promotionsordnung vom 5.3.1981 von Prof. Dr. E.-L. Winnacker betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt.

München, am 16.4.1988

M. Marget

Dissertation eingereicht am 19. April 1988

1. Berichterstatter: Prof. Dr. E.-L. Winnacker

2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Fanning-Honegger

Tag der mündlichen Prüfung: 19. Juli 1988

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von November 1984 bis Oktober 1987 unter der Anleitung von Herrn Dr. Horst Domdey im Laboratorium für Molekulare Biologie - Genzentrum - der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

Herrn Prof. Dr. Ernst-Ludwig Winnacker danke ich für den Arbeitsplatz am Genzentrum und die Teilnahmemöglichkeit an Fortbildungsveranstaltungen.

Besonderer Dank gilt Herrn Dr. Horst Domdey für die Themenstellung und ständige Diskussionsbereitschaft. Seine Freundschaft und aufmunternde Art gaben der Arbeit viel Antrieb.

Für technische Unterstützung bei der Herstellung und Kultivierung der Hybridomzellen gilt mein Dank Prof. Dr. Dr. Bernd-Ulrich von Specht, Ursula Schwarz, Priv. Doz. Dr. Thomas Hünig und Dipl. Biol. Georg Tiefenthaler.

Ferner möchte ich Dr. Ronald Mertz, Sabine Stelzig und Dorit Weigand für rasche und zuverlässige Synthese der verwendeten Oligodeoxynukleotide sowie Christoph Eckerskorn für die Aminosäure-Sequenzanalyse danken.

Auch Karin, Andrea, Sandra, Angela, Dorle, Ansley, Michael, Karl und Jürgen, die auf die eine oder andere Art nicht unwesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben, sei mein Dank ausgesprochen.

Für tatkräftige Unterstützung im Alltag und bei der Korrektur danke ich ganz besonders Gabi.

meinen Eltern



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INHALTSVERZEICHNIS

A	ZUSAMMENFASSUNG	1
B	EINLEITUNG	3
1.	Medizinische Relevanz von <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
2.	Therapiemöglichkeiten	4
2.1.	Aktive Immunisierung	4
2.2.	Passive Immunisierung	5
3.	Aufbau und Struktur von Antikörpern	5
4.	Problemstellung	7
C	VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE	9
1.	Auswahl der Hybridomzelllinie	9
2.	Präparation einer für die cDNA - Synthese geeigneten poly(A)+RNA	11
2.1.	Isolierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA	11
2.2.	Northern-Blot Analyse der RNAs	13
2.2.1.	Probe für die cDNA der leichten Kette und deren Markierung	13
2.2.2.	Probe für die cDNA der schweren Kette und deren Markierung	15
2.2.3.	Northern-Blot Analyse	15
2.2.4.	Anreicherung der poly(A)+RNA	17
3.	cDNA-Synthese	18
3.1.	Synthese des ersten und zweiten cDNA-Stranges	18
3.2.	Modifikation der cDNA-Enden	20
3.3.	Bestimmung des besten Vektor - cDNA Verhältnisses	21
3.4.	Annealingreaktion und Transformation der rekombinanten Plasmide in die Wirtszellen	23
4.	Screening und Konservierung der cDNA-Bank	24
4.1.	Quantifizierung cDNA-enthaltender Klone	24
4.2.	Transfer der Klone in Mikrotiterplatten und auf Nitrocellulosefilter	25

4.3.	Screening nach der cDNA die für die schwere Kette kodiert	25
4.4.	Screening nach der cDNA die für die leichte Kette kodiert	26
4.5.	Charakterisierung der positiv reagierenden Klone	27
4.6.	Southern-Blot Analyse der positiven Klone	27
5.	DNA-Sequenzanalysen	30
5.1.	Subklonierung und Sequenzanalyse der DNA die für die leichte Kette kodiert	30
5.2.	Subklonierung und Sequenzanalyse der DNA die für die schwere Kette kodiert	35
6.	Synthese des Expressionsplasmids	39
6.1.	Vorgehensweise und Durchführung der Klonierung	40
6.2.	Verknüpfung des <i>GALI-10</i> Promotors mit den cDNAs die für schwere und leichte Kette des 6A4-mAk kodieren	42
6.2.1.	Verknüpfung des <i>GALI-10</i> Promotors mit der cDNA die für die leichte Kette kodiert	42
6.2.2.	Verknüpfung der cDNA die für die schwere Kette kodiert mit dem <i>GALI-10</i> Promotor und Teil A der cDNA die für die leichte Kette kodiert	43
6.3.	Restaurierung der nicht-translatierten <i>GALI</i> und <i>GALI0</i> -Leader-Sequenzen vor den 6A4-mAk-Strukturgenen	43
6.4.	DNA-Sequenzanalyse der mutagenisierten Regionen	46
6.5.	Einbau der Hefe-Terminatoren	48
6.5.1.	Einbau des Actin-Terminators an Teil B der cDNA die für die schwere Kette kodiert	48
6.5.2.	Einbau des ADH-Terminators an Teil B der cDNA die für die schwere Kette kodiert	48
6.6.	Fertigstellung des Expressionsplasmids pM	49
7.	Expressionsversuche	53
7.1.	Transformation des Expressionsplasmids in <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	53
7.2.	Kultivierung der Zellen unter promotorinduzierenden und -nichtinduzierenden Bedingungen	53
7.3.	Aufarbeitung der Zellen und des Zellkulturüberstandes - Isolierung von Proteinen und RNA	54
7.3.1.	Northern-Blot Analyse von RNA induzierter und nichtinduzierter Hefezellen	55
7.3.2.	Analyse der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western - Blot	56
7.4.	Austausch der Signalpeptid kodierenden cDNA der schweren Kette	59
7.4.1.	Mutagenese der Signalpeptid kodierenden cDNA der schweren Kette	60
7.4.2.	DNA-Sequenzanalyse der mutagenisierten Region	61
7.4.3.	Zusammenbau der Fragmente und Transformation	63
7.5.	Isolierung und Analyse der Proteine	64
7.6.	Löslichkeitsverhalten der Proteine	66

D	DISKUSSION	70
1.	Erstellen der cDNA-Bank	70
2.	Die DNA-Sequenzen des 6A4-Antikörpers und ihre Bedeutung innerhalb bekannter Immunglobulinsequenzen	71
2.1.	Sequenzdaten die für die κ leichte Kette kodieren	72
2.2.	Sequenzdaten die für die γ schwere Kette kodieren	74
3.	Expression der schweren und der leichten Kette	76
E	MATERIAL UND METHODEN	80
1.	Geräte	80
2.	Chemikalien - Enzyme - Antikörper	81
3.	Molekulargewichtlängenstandards und Oligodeoxynukleotide	84
4.	Medien	87
4.1.	Bakterienmedien	87
4.2.	Hefemedien	89
4.3.	Hybridomzellmedium	90
5.	Verwendete Zellen	90
5.1.	Bakterien	90
5.2.	Hefe	91
5.3.	Hybridomzelllinie	91
6.	Puffer und Lösungen	91
7.	cDNA-Klonierung und Analyse	93
7.1.	Vermehrung von Hybridomzellen	93
7.1.1.	Anzucht der Zellen in Suspensionskultur	93
7.1.2.	Anzucht der Zellen im Ascites und Isolierung monoklonaler Antikörper	94
7.2.	Vitalfärbung von Zellen mit Trypanblau	94
7.3.	Präparation von Gesamt-RNA	94
7.4.	Isolierung von poly(A) ⁺ RNA	95
7.5.	Elektrophorese von denaturierter RNA	96
7.6.	Agarosegelelektrophorese	96
7.7.	Southern-Blot	97
7.8.	Northern-Blot	97
7.9.	Reinigen von Oligodeoxynukleotiden	98
7.10.	[³² P]-Endmarkierung von Oligodeoxynukleotiden	99
7.11.	[³² P]-Markierung doppelsträngiger DNA Fragmente	99

7.12.	Hybridisierung mit [32 P]-endmarkierten Oligodeoxynukleotiden	100
7.13.	Hybridisierung mit [32 P]-markierten DNA-Fragmenten	101
7.14.	Abwaschen hybridisierter Oligodeoxynukleotid-Proben von NC-Filtern	101
7.15.	cDNA Synthese	102
7.16.	Verknüpfung der cDNA mit dem Vektor	104
7.17.	Koloniehybridisierung - Screenen der cDNA Bank	105
7.18.	Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	106
7.19.	Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen	106
7.20.	Restriktionsendonukleasespaltungen von DNA	108
7.21.	Partialsplattung von DNA	108
7.22.	Auffüllreaktion von versetzten DNA-Enden mit Klenow-Polymerase	109
7.23.	Abspaltung der 5'-Phosphatreste von DNA-Molekülen mit alkalischer Phosphatase	109
7.24.	Ligation DNA - DNA	110
7.25.	Transformation von <i>E. coli</i> K12-Stämmen	110
7.26.	Transformation von Hefezellen	111
7.27.	Herstellung von ExoIII - Exo VII - Deletionsmutanten	112
7.28.	Präparation einzelsträngiger M13 Phagen-DNA	114
7.29.	Gezielte Mutagenese mit Hilfe von Oligodeoxynukleotiden	114
7.30.	Plaquehybridisierung	115
7.31.	Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid DNA	116
7.32.	Sequenzgel-Elektrophorese	117
8.	Proteinexpression und Analyse	118
8.1.	Induktion des <i>GAL1-10</i> Promotors	118
8.2.	Aufschluß von Hefezellen mit der French-Press	118
8.3.	Aufschluß von Hefezellen mit dem Bead-Beater	119
8.4.	Proteinisolierung aus Hefezellkulturüberständen	119
8.5.	Proteinmengenbestimmung	120
8.6.	SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen	120
8.7.	Western-Blot	121
8.8.	Ponceau S Färbung von auf NC-Filtern geblotteten Proteinen	121
8.9.	Coomassiefärbung von Proteingelen	121
8.10.	Immunreaktion	122
F	AN H A N G	124
1.	Übersicht aller in dieser Arbeit verwendeten Plasmide	124
2.	Restriktionskarten	127
2.1.	Schwere Kette kodierende cDNA und flankierende Sequenzen	127
2.2.	Leichte Kette kodierende cDNA und flankierende Sequenzen	130
G	L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S	134

ABKÜRZUNGEN

6A4-cDNA	cDNA, die für den Antikörper 6A4 kodiert
6A4-mAK	monoklonaler Antikörper 6A4
6A4-mRNA	mRNA, die für den Antikörper 6A4 kodiert
6A4-Zellen	Hybridomzellen, die den Antikörper 6A4 produzieren
Ap	Ampicillin
Ap ^r	Ampicillin-resistent
APS	Ammoniumperoxodisulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	bovine serum albumine
cpm	counts per minute
D	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Deoxyribonukleinsäure
dNTP	Deoxynukleotidtriphosphat
dsDNA	Doppelstrang-DNA
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EM23BBP	Proteine aus Bead-Beater-Aufschluß-Pellet von YpEM23
EM23BBÜ	Proteine aus Bead-Beater-Aufschluß-Überstand von YpEM23
EM23Ü	Proteine aus Überstand einer YpEM23 Zellkultur
EM31FPP	Proteine aus French-Press-Aufschluß-Pellet von YpEM31
EM31FPÜ	Proteine aus French-Press-Aufschluß-Überstand von YpEM31
EM31Ü	Proteine aus Überstand einer YpEM31 Zellkultur
EtBr	Ethidiumbromid
EtOH	Ethanol
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LMP-Agarose	low melting point Agarose
mAk	Monoklonale(r) Antikörper
MBBP	Proteine aus Bead-Beater-Aufschluß-Pellet von YpM
MBBÜ	Proteine aus Bead-Beater-Aufschluß-Überstand von YpM
MFPP	Proteine aus French-Press-Aufschluß-Pellet von YpM
MFPÜ	Proteine aus French-Press-Aufschluß-Überstand von YpM
Min	Minuten
MKBBP	Proteine aus Bead-Beater-Aufschluß-Pellet von YpMK
MKBBÜ	Proteine aus Bead-Beater-Aufschluß-Überstand von YpMK
MKFP	Proteine aus French-Press-Aufschluß-Pellet von YpMK
MKFPÜ	Proteine aus French-Press-Aufschluß-Überstand von YpMK
MKÜ	Proteine aus Überstand einer YpMK Zellkultur
MÜ	Proteine aus Überstand einer YpM Zellkultur
NBCS	new born calf serum
NC	Nitrocellulose
NP40	Nonidet P40 (Detergens)



OD _{xxx}	Optische Dichte, gemessen bei xxx nm Wellenlänge und einer Schichtdicke von 1 cm
Omp	Oberflächenmembranprotein(e)
<i>P. aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
poly(A) ⁺ RNA	Poly(A)-haltige mRNA
RT	Raumtemperatur (22 °C)
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
Sek	Sekunden
ssDNA	single strand DNA (Einzelstrang-DNA)
Std	Stunden
Tc	Tetracyclin
Tc ^r	Tetracyclin resistent
TEMED	N,N,N',N''-Tetramethylethylendiamin
T _m	Schmelzpunkt doppelsträngiger DNA in °C
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Units
UpM	Umdrehungen pro Minute
X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-Indoyl-β-D-Galaktosid
YpEM23	Mit Plasmid pEMBLYe23 transformierte F808-Hefezellen
YpEM31	Mit Plasmid pEMBLYe31 transformierte F808-Hefezellen
YpM	Mit Plasmid pM transformierte F808-Hefezellen
YpMK	Mit Plasmid pMK transformierte F808-Hefezellen

A ZUSAMMENFASSUNG

Das Bakterium *Pseudomonas aeruginosa* stellt ein klinisches Problem dar, da es in immungeschwächten Patienten häufig nosokomiale Infektionen mit tödlichem Ausgang verursachen kann. Chemotherapie mit handelsüblichen Antibiotika ist meist nicht wirkungsvoll, da *P. aeruginosa* rasch und effizient Resistenzen ausbilden kann. In Maus und auch im Menschen können Antikörper Protektivität gegenüber *P. aeruginosa* vermitteln. Da es aufwendig ist, geeignetes Serum in genügend großen Mengen zu gewinnen, wird versucht, dieses durch monoklonale Antikörper zu ersetzen. Monoklonale Antikörper produzierende, permanente Hybridomzelllinien konnten bisher nur aus tierischen Zellen etabliert werden. Von diesen Zellen sekretierte Antikörper sind aber im Menschen immunogen, daher nur von sehr beschränktem Nutzen und zudem relativ teuer. Es wird daher versucht, einen Weg zu finden, monoklonale Antikörper in anderen Zellen zu exprimieren und deren hypervariable Domänen mit den konservierten Bereichen aus menschlichen Immunglobulinen auf DNA-Niveau neu zu rekombinieren. Ziel dieser Arbeit war es, einen für *P. aeruginosa* spezifischen monoklonalen Antikörper in Hefe zu exprimieren und mit der Sequenzanalyse der für den monoklonalen Antikörper kodierenden cDNA Grundlagen für die "Humanisierung" des Antikörpers zu liefern.

Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurden von Specht und Mitarbeitern Hybridomzelllinien etabliert, deren B-Lymphozyten aus Mäusen stammten, die zuvor mit den äußeren Membranproteinen F, H2 und I aus *P. aeruginosa* immunisiert worden waren. Sieben dieser Zelllinien sekretieren monoklonale Antikörper, die mit allen bekannten *P. aeruginosa* Serotypen kreuzreagieren und Protektivität in *P. aeruginosa* infizierten Mäusen vermitteln. Diejenige Zelllinie, deren Antikörper den besten Schutz zeigte, wurde für weitere Experimente ausgewählt. Da die Expression des Antikörpers in Hefezellen beabsichtigt war, Hefe jedoch Säuger mRNA-Vorläufer nicht in der notwendigen Weise prozessieren kann, mußte zuerst die entsprechende cDNA synthetisiert werden. Hierfür wurde zunächst aus der Zelllinie Gesamt-RNA isoliert. Aus der daraus angereicherten poly(A)⁺RNA konnten die vollständigen cDNAs, die für die beiden Peptide des Antikörpers kodieren, synthetisiert und kloniert werden. Durch DNA-Sequenzanalyse wurden die beiden kodierenden Regionen in ihrer Primärstruktur aufgeklärt.

Aus Gründen einer besseren Funktionalität wurden für die Konstruktion des Expressionsplasmids ausschließlich homologe DNA-Sequenzen aus Hefen eingesetzt. Da keine gesicherten Erkenntnisse über die Toxizität der zu exprimierenden heterologen Peptide gegenüber ihrem Wirtstamm vorlagen, wurde ein induzierbarer Promotor ausgewählt. Es handelt sich um den *GAL1-10* Promotor aus *S. cerevisiae*, der eine bidirektionelle Aktivität

aufweist und durch Galaktose induzierbar ist. Durch eine Reihe von Klonierungs- und Mutageneseschritten wurden schwere und leichte Kette kodierende DNA beidseitig mit diesem verknüpft. Die Endpunkte der beiden Transkriptionseinheiten wurden mit Terminationssignalen aus *S. cerevisiae* versehen, da diese die Expression erhöhen. Um mögliche Rekombinationsereignisse homologer Sequenzen ausschließen zu können, wurde einerseits das Terminationssignal des ADH(Alkohol Dehydrogenase)-Gens, andererseits dasjenige des Actin-Gens verwendet. Das fertige Expressionsplasmid wurde in die Hefe *S. cerevisiae* transformiert. Die so erhaltenen Zellen wurden kultiviert und der in ihnen enthaltene *GALI-10* Promotor mit Galaktose induziert. Um die mögliche Auswirkung einer homologen Signalpeptidsequenz gegenüber einer heterologen zu vergleichen, wurde der entsprechende DNA-Bereich durch die DNA, die für das Killertoxin-Signalpeptid aus *Kluyveromyces lactis* kodiert, substituiert. Dadurch konnten in Expressionsexperimenten die Ausbeute der schweren Kette gesteigert werden. Außerdem wurde durch eine geänderte Aufschlußmethode der Zellen die Ausbeute an isolierbaren Proteinen angehoben.

Die erhaltenen Expressionsplasmide und cDNAs, die für den monoklonalen Antikörper kodieren, stellen Ausgangsmaterial für weitere Expressionsversuche dar. Die Sequenzdaten liefern darüberhinaus die Grundlage einer "Humanisierung" des Antikörpers.

B EINLEITUNG

1. MEDIZINISCHE RELEVANZ VON *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

Pseudomonas aeruginosa stellt neben Colibakterien und Klebsiellen den Hauptvertreter der opportunistischen gramnegativen Bakterien dar.

Es ist ein streng aerob wachsendes, Feuchtigkeit benötigendes, polar begeißeltes Stäbchenbakterium von 1.5 - 3.0 µm Länge und 0.3 - 0.6 µm Breite (Brandis und Otte, 1984).

P. aeruginosa tritt mitunter dort in Erscheinung, wo andere Bakterien durch Desinfektionsmittel beseitigt werden, da er gegen diese sehr widerstandsfähig ist und manche sogar als Nahrungsquelle nutzt (Lawbury, 1951). Somit ist dieser Keim auch in Kliniken anzutreffen, wo er beispielsweise iatrogen über Instrumente (z.B. Katheder) oder Medikamente (z.B. Augentropfen) übertragen wird.

Ubiquitär besiedelt dieser Keim auch ohne klinische Symptomatik den Gastrointestinaltrakt bei 7 - 25% gesunder Personen (Doggett, 1979; Cross, 1985).

Zu den infektionsgefährdeten Individuen gehören frisch operierte Personen, Mukoviscidose Patienten, Brandverletzte, Krebspatienten, AIDS-Patienten und alle, die entweder ein geschwächtes Immunsystem haben oder immunsupprimiert sind. Bei ihnen führt die Infektion oft zu einer Sepsis oder *Pseudomonas*-Pneumonie mit Mortalitätsraten von 50% und mehr (McManus, 1981; Reynolds et al., 1980; Class et al., 1987; Pruitt et al., 1984; Böhm, 1987; Bodey et al., 1983; Graybill et al., 1973).

Die hohe Sterblichkeit wird auf die invasive Potenz von *P. aeruginosa* durch die Ausbildung von Virulenzfaktoren, wie z.B. Exotoxin A, Elastase u.a. zurückgeführt, sowie auf häufig auftretende Resistenzen von *P. aeruginosa* gegenüber gebräuchlichen Antibiotika zur Behandlung gramnegativer Bakterien (Pollack et al., 1977; Pavlouskis und Wretling, 1979; Hancock, 1986; Zak, 1980).

In den letzten Jahren wurde deshalb die Suche nach einer geeigneten Immunprophylaxe stark vorangetrieben. Sie konzentrierte sich sowohl auf die aktive als auch auf die passive Immunisierung und der Kombination aus beiden.

Da es eine Vielzahl verschiedener *P. aeruginosa* Stämme gibt, forderte Homma für eine Vaccine die Eigenschaft gegen alle Serotypen der Spezies zu schützen (Homma, 1982). Auf Betreiben des "Subcommittee on *Pseudomonadaceae* and Related Organisms of the International Association of Microbiological Societies" entstand ein von Lanyi und Bergan

(1978) beschriebenes, einheitliches System zur Serotypisierung von *P. aeruginosa*. Es handelt sich um das "International Antigenic Typing Scheme" (IATS) mit 19 definierten Serotypen. Die serologische Spezifität der Klassifikation beruht auf hitzestabilen, somatischen Oberflächen-Antigenen (O-Antigenen). Die Variabilität begründet sich im unterschiedlichen Bau der Region I der Lipopolysaccharide der äußeren Membran, die nicht mit dem weiter unten zitierten Oberflächen-Membranprotein I zu verwechseln ist (Seltmann, 1982).

2. THERAPIEMÖGLICHKEITEN

2.1. Aktive Immunisierung

Für die aktive Immunisierung wurden in der Vergangenheit in erster Linie Lipopolysaccharide als antigene Strukturen eingesetzt, die jedoch auf Grund des in ihnen enthaltenen endotoxischen Lipid A Anteils und ihrer limitierten Serotypspezifität bisher nicht zum gewünschten Ziel führten (Jones et al., 1979; Cryz et al., 1986; MacIntyre et al., 1986; Pennington, 1979). Erfolgsversprechender sind weitestgehend gereinigte Oberflächen-Membranproteine aus einem Gesamtzellextrakt, die im Mausmodell Schutzwirkung gegenüber *P. aeruginosa* vermitteln (Lam et al., 1985; von Specht et al., 1985; von Specht et al., 1987; Matthews-Greer et al. 1987). Zu den angesprochenen Oberflächen-Membranproteinen gehören die Proteine D (M_r 50 000 Da), E (M_r 45 000 Da), F (M_r 33 000 Da), G und H (M_r 21 000 Da) und I (M_r 8 000 D) (Mizuno und Kageyama, 1979), von welchen F, H und I als Antigene benutzt wurden (von Specht, 1987; Lam, 1985; Matthews-Greer, 1987). Sie sind Bestandteile der äußeren Membran aller 19 Serotypen (von Specht et al., 1987; Mutharia, 1982). Anwendungen beim Menschen sind bisher wegen der ungenügenden Reinheit noch nicht durchgeführt worden.

Zur Zeit werden Impfversuche mit chemisch synthetisierten und an Trägermoleküle gekoppelten Peptiden mit Mäusen durchgeführt, deren Sequenz von klonierter und sequenzierter *P. aeruginosa* DNA abgeleitet wurde (Duchêne et al., 1988). Der entsprechende Abschnitt kodiert dominante, exponierte Oberflächenantigene (OmpF bzw. OmpI). Man erhofft sich wegen des höheren Reinheitsgrades der synthetischen Antigene geringere Nebeneffekte (Duchêne, pers. Mitteilung). Es ist allerdings schwierig den richtigen, immunogenen Teil als solchen zu identifizieren. Ob er dann auch den gewünschten Effekt zeigt ist fraglich und bleibt von Fall zu Fall im Experiment auszutesten.

2.2. Passive Immunisierung

Im Fall der passiven Immunisierung werden bereits klinische Versuche mit Hyperimmunseren menschlicher Herkunft, in Kombination mit Antibiotika, durchgeführt, die Schutzwirkung bewirken (Collins et al., 1987).

Eine andere Möglichkeit der Immunprophylaxe zeigten Martinez und Callahan (1985), indem sie Humanserum und Exotoxin A simultan verabreichten und damit Protektivität nachweisen konnten.

Beckert (1987) zeigte im Mausmodell, daß mit Hilfe monoklonaler Antikörper die Sterblichkeitsrate von *P.aeruginosa* infizierten Mäusen um bis zu 35% gegenüber der Kontrollgruppe gesenkt werden kann. Wegen der Immunogenität von aus Mäusen stammenden monoklonalen Antikörpern im Menschen sind diese allerdings nur sehr beschränkt einsatzfähig, d.h., sie können nur einmal verabreicht werden, was in den meisten Fällen nicht ausreichend ist.

Eine mögliche Lösung des Problems bietet die "Humanisierung" derjenigen Teile des monoklonalen Antikörpers, die ihn für die Maus charakteristisch machen und ihn im Menschen als Fremdkörper erscheinen lassen.

Hierfür sind einige Angaben zur genomischen und morphologischen Organisation von Antikörpern notwendig.

3. AUFBAU UND STRUKTUR VON ANTIKÖRPERN

Antikörper - oder Immunglobuline - sind eine Gruppe von Glykoproteinen, die im Serum und Gewebeflüssigkeiten aller Mammalia vorkommen. Ihre Produktion wird in Gegenwart körperfremder, immunogener Moleküle (Antigene) induziert. Sie binden spezifisch an diese. Der Grundaufbau aller Immunglobuline ist eine Einheit, die aus zwei identischen schweren und zwei ebenfalls identischen leichten Polypeptidketten besteht. Die Klasse und Subklasse eines Immunglobulinmoleküls wird durch den Typ der schweren Kette bestimmt.

In Mensch und Maus sind folgende Klassen und Subklassen bekannt:

Mensch:	IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, IgA2, IgM1, IgM2, IgD, IgE;
Maus:	IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgA1, IgA2, IgM, IgE;

Die vier Polypeptidketten sind - abhängig von der Zugehörigkeit zu einer der Immunglobulin-klassen - durch drei und mehr Disulfidbindungen kovalent miteinander verbunden.

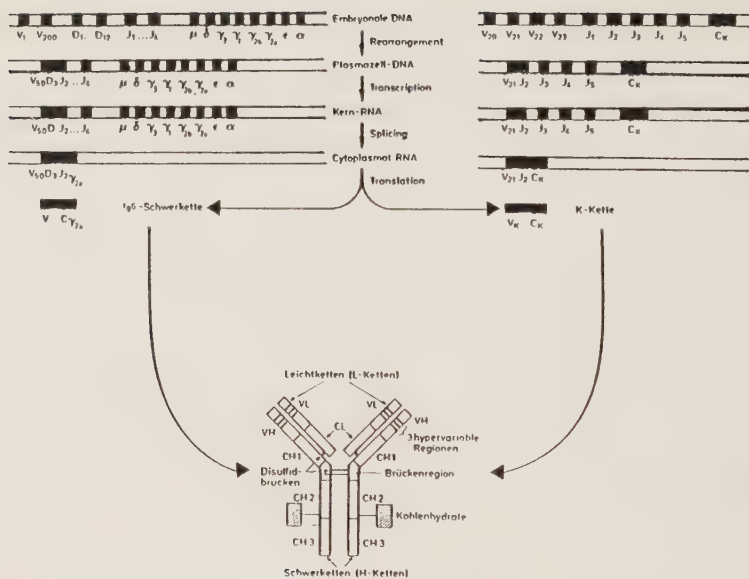


Abb. 1: Wichtige Stadien während der Synthese der schweren und der leichten Kette eines Immunglobulins, dargestellt auf DNA-, RNA- und Protein-Ebene. Die beiden Ketten werden in der Maus auf den Chromosomen 6, 12 und 16 kodiert. Die Information einer jeden Peptidkette verteilt sich auf mehrere Gen-Regionen. Im Embryonalzustand enthält jede B-Zelle die Information für circa 200 V-, 12 D- und 4 J-Segmente der schweren Kette, sowie die Information für 200 V- und 4 J-Segmente der leichten Kette. Während der B-Zell-Reifung finden Rearrangements dieser Segmente statt, wobei je eines der Segmente miteinander kombiniert wird. Hiermit und während der Prozessierung des primären Transkriptes wird die Diversität erzeugt. Während der Prozessierung wird außerdem der konstante Teil kodierende Bereich der entsprechenden Polypeptidkette angefügt.

Bei Maus und Mensch ist die leichte Kette des IgG durch zwei, die schwere durch vier Domänen charakterisiert. Erstere gliedert sich in einen variablen (VL) und einen konstanten Teil (CL), letztere in einen variablen (VH) und drei konstante (CH1, CH2, CH3). Durch Papain werden Immunglobuline in drei Fragmente (F) gespalten: Zwei antigenbindende (Fab) und eines, das nur noch konstante Sequenzen enthält (Fc). Jedes Fab enthält die Domänen VL-CL und VH-CH1. Sie sind durch eine Disulfidbrücke am Carboxy-Terminus miteinander verbunden.

Den Domänen der Immunglobuline konnten bislang folgende Funktionen zugeordnet werden:

- V_H und V_L bilden die Antigenbindungsstelle aus;
- C_{H1} bindet das C4b Fragment des klassischen Komplementsystems;
- C_{H2} fixiert C1q des klassischen Komplementsystems und kontrolliert dessen Katabolismusrate;
- C_{H3} erkennt den F_C -Rezeptor auf Makrophagen und Monozyten;
- C_{H2} und C_{H3} binden Protein A von Staphylokokken und treten in Wechselwirkung mit dem F_C -Rezeptor auf plazentalen Synzytiotrophoblasten, Neutrophilen und Killerzellen;

Die Anordnung der Gene und der Weg bis zur reifen Polypeptidkette ist am Beispiel für eine schwere und eine leichte Kette im Schema der Abbildung 1 dargestellt.

4. PROBLEMSTELLUNG

Die Vermehrung und Herstellung von monoklonalen Antikörpern aus Zellkulturen oder Aszites ist sehr aufwendig. Es wird daher versucht, mit Hilfe neurekombinierter DNA Moleküle, die monoklonalen Antikörper in Mikroorganismen, die mit geringerem Aufwand und in größerer Menge kultivierbar sind als Zellkulturen, zu produzieren. Hierfür bietet bei der Expression fremder Polypeptide die Hefe *S. cerevisiae* eine attraktive eukaryotische Alternative gegenüber *E. coli*, dessen Mechanismen der Transkription, Translation und posttranslationalen Modifikation von denen höherer Organismen erheblich abweichen. *S. cerevisiae* ist für den Menschen apathogen, frei von Endotoxinen und wird bereits seit Jahrzehnten in der industriellen Fermentation von Nahrungsmitteln eingesetzt. Aus der Vielzahl heterolog exprimierter eukaryotischer Proteine in Hefe seien als Beispiele humanes α -Interferon, Thaumatin pflanzlicher Herkunft und Hepatitis B Antigen genannt (Derynck et al., 1983; Edens et al., 1984; Hilleman, 1987). Die Verträglichkeit des Hepatitis B Antigens als Vaccine ist beschrieben (Hilleman, 1987).

S. cerevisiae besitzt im Gegensatz zu *E. coli* ein Sekretionssystem, das demjenigen höherer eukaryotischer Systeme sehr ähnlich ist (Schekman und Novick, 1982). Außerdem ist *S. cerevisiae* in der Lage, Proteine, wenn auch unterschiedlich, zu glykosilieren. Diese Modifikation wird für die Funktionalität und die Stabilität der Antikörper benötigt. Sowohl Antigenspezifität als auch Effektorfunktionen werden dadurch beeinflusst (Nose und Wigzell, 1983; Kabat et al., 1987).

In höheren eukaryotischen Zellen geht der Weg der Proteinbiosynthese von der DNA über Prä-mRNA und reifer mRNA zum Protein. Dabei wird die Prä-mRNA zur reifen mRNA prozessiert, d.h. die in ihr zunächst noch vorhandenen nicht kodierenden Regionen - den sogenannten Introns - werden herausgeschnitten und die noch verbleibenden kodierenden Abschnitte - den sogenannten Exons - wieder zusammengefügt (siehe auch Schema oben).

Die Hefe *S. cerevisiae* führt diese Prozessierung von heterologer Prä-mRNA nicht oder zumindest fehlerhaft aus (Langford et al., 1983). Die in sie eingebrachte zu exprimierende DNA Sequenz sollte daher keine Introns mehr enthalten, sofern ein den Exons entsprechendes Protein synthetisiert werden soll. Aus diesem Grund muß die bei der Expression verwendete DNA eine cDNA - eine zur reifen mRNA komplementäre DNA - sein.

Der in dieser Arbeit bearbeitete monoklonale Antikörper ist spezifisch für das Oberflächenmembranprotein I aus *P. aeruginosa*. Er stammt aus Maus B-Lymphozyten, die mit NS-1 Myelomzellen fusioniert wurden, und gehört der IgG2a Klasse an (Eckhardt, A., Heiss, M., Ehret, W., Permanetter, W. und von Specht, B.-U., eingereicht).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die cDNAs, die für die schwere und die leichte Kette des monoklonalen Antikörpers 6A4 kodieren, zu synthetisieren und zu klonieren. Eine sich anschließende Sequenzierung sollte die Zuordnung der daraus ableitbaren Aminosäuresequenz zu einem bestimmten Immunglobulinsubklassen- und Alleltyp ermöglichen. Zudem wären damit die für die Klonierung notwendigen Sequenzen charakterisiert.

Die cDNA sollte in geeigneter Weise in ein Hefe-Expressionsplasmid eingebaut werden, das sowohl in *E. coli* als auch in Hefe stabil persistieren kann.

Wegen einer möglichen Toxizität der exprimierten Polypeptide, die ein Absterben der Kultur zur Folge haben könnte, sollte der Promotor vor den beiden Strukturgenen induzierbar sein.

Zuletzt sollte die Frage beantwortet werden, ob der monoklonale Antikörper exprimiert und gegebenenfalls sekretiert wird. Im Fall daß dies nicht geschieht, wäre eine entsprechende Modifikation des DNA-Konstruktes durchzuführen. Die heterologe Expression der beiden Antikörperketten sollte auf Nukleinsäure- und Proteinebene untersucht werden.

C VERSUCHSDURCHFÜHRUNG UND ERGEBNISSE

I. AUSWAHL DER HYBRIDOMZELLINIE

Für die Klonierung und weiterreichende Versuche, insbesondere im Hinblick auf die mögliche Anwendung des Antikörpers als Impfstoff, sollte dieser eine Reihe von Anforderungen erfüllen.

Insgesamt standen 7 monoklonale Antikörper produzierende Hybridomzelllinien zur Verfügung. Die Zelllinien waren von Eckhardt et al. (1988) etabliert worden. Die dabei für die Fusionierung verwendeten Lymphozyten stammten aus, mit den *P. aeruginosa* Membranproteinen OmpF, OmpH und OmpI, immunisierten Balb/c Mäusen (von Specht et al., 1987).

Die Kriterien für die Auswahl der am besten geeigneten Zelllinie waren im wesentlichen von folgenden Eigenschaften abhängig:

- die Zelllinie sollte einen mit OmpF, OmpH oder OmpI reagierenden monoklonalen Antikörper sekretieren;
- dieser sollte mit allen 19 *P. aeruginosa* Serotypen möglichst gleichmäßig gut kreuzreagieren,
- positiv im CIq Bindungstest sein,
- der IgG - Klasse angehören,
- die Rate der von der Zelllinie produzierten monoklonalen Antikörper sollte hoch sein,
- er sollte Schutzwirkung in mit *P. aeruginosa* infizierten Mäusen bewirken.

Um diese Eigenschaften zu überprüfen, wurden die Ergebnisse und Daten anderer Arbeitsgruppen zusammengetragen und zum Teil ausgewertet.

Die Forderung nach einer Reaktion mit OmpF, OmpH oder OmpI ergab sich aus der Tatsache, daß die Mäuse mit diesen Proteinen immunisiert worden waren, daher auch mit diesen reagieren sollten.

Überprüft wurden diese Eigenschaften von Beckert (1986), indem sie Western-Blot-Experimente mit OmpF, OmpH, OmpI und den 7 monoklonalen Antikörpern durchführte. Außerdem typisierte sie die Immunglobuline.

Für eine passive Immunisierung sind Immunglobuline der Klasse G am besten geeignet, da sie nach einer Reaktion des Immunsystems den größten Teil der Antikörper repräsentieren (Roitt et al., 1985).

Zudem wurde der prozentuale Anteil der Gammaglobuline in der Aszitesflüssigkeit bestimmt (Beckert, 1986). Dadurch wurde die Zelllinie mit der höchsten Antikörperproduktionsrate ermittelt.

Um die geforderte Kreuzreaktivität mit allen *P. aeruginosa* Serotypen zu überprüfen, wurden mit Gesamtzellextrakten und den monoklonalen Antikörpern Western-Blot-Experimente, sowie Immunfluoreszenztests mit intakten *P. aeruginosa* Zellen durchgeführt (von Specht et al., 1987; Eckhardt et al., 1988, eingereicht).

Von den vorhandenen Daten des Immunfluoreszenztests wurden deren Mittelwerte und Standardabweichungen der log₂-Werte der Verdünnungsstufen berechnet. Ein mit allen 19 Serotypen gut reagierender monoklonaler Antikörper sollte neben dem relativ höchsten Mittelwert auch die relativ niedrigste Standardabweichung zeigen.

Der Clq - Bindungstest gibt einen Anhaltspunkt über die biologische Aktivität, die unter anderem in der Fähigkeit der Antikörper begründet liegt, Komponenten des klassischen Komplementsystems zu binden.

Der Test wurde von Eckhardt et al. (1988, eingereicht) durchgeführt.

Anti- körper- bezeich- nung ^a	Ig Typ ^b	% Gamma- globulin im Aszites ^c	Mittel- wert der Ver- dünnung ^d	Standard- abweichung der Ver- dünnung ^e	Reaktion mit OmpF, OmpH oder OmpI ^f	Reaktion mit Anzahl von Sero- typen ^g
6C1	IgM	0.09	9.3	1.7	I	19
2B2	IgG2a	0.6	7.3	1.5	F	19
2A1*	IgG2b	0.19	8.4	1.1	I	19
6A4*	IgG2a	1.0	9.4	1.0	I	19
6D6	IgG1	0.5	8.2	1.7	I	19
5B4	IgG2a	0.07	8.8	1.5	I	19
3A4	IgG2a	0.08	6.0	2.7	F	17

Tab. 1: Zusammenfassung der für die Auswahl der Zelllinie herangezogenen Daten.

a Name des Antikörpers;

b Immunglobulinklasse, bestimmt durch ELISA (Beckert, 1986);

c Prozentualer Proteinanteil der Gammaglobulinfraktion in der Aszitesflüssigkeit (Beckert, 1986);

d Mittelwert der log₂-Werte der Verdünnungsstufen, die mit allen 19 Serotypen im Immunfluoreszenztest noch positive Reaktion zeigten;

e Standardabweichung der in ^d beschriebenen Werte;

f Im Western-Blot ermittelte Reaktion des jeweiligen mAK mit OmpF, OmpH oder OmpI (Beckert, 1986);

g Anzahl der Serotypen mit welchen der jeweilige mAK kreuzreagiert (von Specht, 1987);

* Positiv im Clq Bindungstest (Eckhardt, 1988, eingereicht);

Die zu Beginn der Arbeit vorliegenden Ergebnisse und Daten wurden zusammengefaßt und ausgewertet (Tabelle 1).

Die Daten lieferten die Grundlage für die Auswahl der Zelllinie.

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die mit 6A4 und 2A1 bezeichneten monoklonalen Antikörper die oben geforderten Kriterien am besten erfüllen. Sie vermitteln zudem in Mäusen Schutzwirkung gegen *P. aeruginosa* (Eckhardt et al., 1988, eingereicht). Wegen der besseren Produktionsrate und dem höheren Mittelwert im Immunfluoreszenztest wurde die den 6A4-mAK sekretierende Zelllinie für vorliegende Arbeit ausgewählt.

2. PRÄPARATION EINER FÜR DIE cDNA-SYNTHESE GEEIGNETEN poly(A)+RNA

Die beiden Polypeptide, die Bestandteile des 6A4-mAk sind, sollten zu einem späteren Zeitpunkt in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert werden. Auf der Tatsache basierend, daß Introns heterologer Gene in *S. cerevisiae* nicht zuverlässig prozessiert werden, mußten zuerst die cDNAs, die für die schwere und die leichte Kette kodieren, synthetisiert und kloniert werden (Langford et al., 1983).

2.1. Isolierung und Qualitätsbestimmung der Gesamt-RNA

Voraussetzung für die Schaffung einer cDNA-Bank ist die Präparation genügend großer Mengen (1-5 mg) qualitativ hochwertiger, d.h. nicht degraderter RNA aus den betreffenden Zellen.

Von den im flüssigen Stickstoff gelagerten 6A4 sekretierenden Zellen wurde eine Suspensionskultur angelegt. Nachdem die Zellen eine Dichte von $9 \times 10^5/\text{ml}$ in 200 ml Medium erreicht hatten, wurde mittels der "Hot-Phenol"-Methode Gesamt-RNA aus ihnen isoliert.

Die Analyse von 20 µg RNA der insgesamt isolierten 3.4 mg RNA auf einem 1.2%igen Agarosegel zeigte RNA mit einer Größe von zwischen 0.1 und 2 kb, was für einen starken Abbau des Materials sprach. Normalerweise ist der überwiegende Teil zwischen einigen 100 und über 10 000 bp groß (Knippers, 1982), wovon nach Agarosegelelektrophorese und Ethidiumbromidfärbung ein Anteil zwischen 0.5 kb und 4 kb Größe zu sehen sein sollte.

Eine vor der RNA-Isolierung durchgeführte Trypanblau-Färbung der in Suspensionskultur gewachsenen Zellen hatte ergeben, daß nur 64% von 165 gezählten Zellen lebten. Diese geringe Vitalität war möglicherweise die Ursache für eine Kontamination mit RNasen durch abgestorbene Zellen.

Bessere Vitalität und damit auch eine bessere Qualität der RNA kann durch in der Bauchhöhle von Mäusen gewachsenen Hybridomzellen erzielt werden. Dort finden sie in der Regel geeignetere Wachstumsbedingungen und bleiben meist steril. Die Peritonealflüssigkeit mit den Zellen und den von ihnen produzierten Antikörpern wird auch als Aszites bezeichnet. Für diese Art der Zellvermehrung waren 3×10^7 Zellen aus einer Suspensionskultur notwendig.

Nach deren Anzucht, Zentrifugation und Aufnahme in physiologischer NaCl - Lösung wurden sie in pristankonditionierte BALB/c Mäuse intraperitoneal injiziert. 10 ml Aszitesflüssigkeit, die bei einer 7 Tage nach der Inokulation gemachten Punktion von drei Mäusen gewonnen wurde, enthielten insgesamt 6×10^7 Zellen mit einer Vitalität von 90% bei 187 gezählten Zellen.

Aus diesen Zellen wurde mit derselben Methode 1.8 mg Gesamt-RNA gewonnen. Die unter gleichen Bedingungen gemachte Analyse zeigte diesmal RNA in dem zu erwartenden Größenbereich von 0.5-4 kb (Abb. 2).

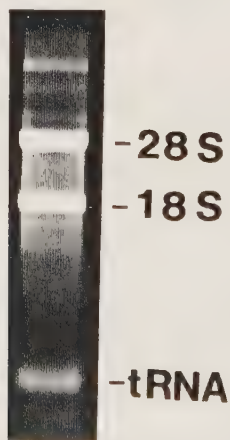


Abb. 2: Die in einem 1.25%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten 20 µg Gesamt-RNA aus 6A4-Zellen. Zu sehen sind drei Banden: 28S rRNA (ca. 4.7 kb), 18S rRNA (ca. 2.2 kb) und 4-5S tRNA (ca. 70-120 Nukleotide), sowie die heterogene mRNA.

Die für die Fusionierung verwendete Myelomzelllinie P3-NS1/1-AG4-1 (kurz NS-1) sollte eine "non-producer"-Linie sein und daher keine immunglobulinspezifische mRNA enthalten. Damit wird das Auftreten anderer als der gewünschten Immunglobuline ausgeschlossen. Um

dies zu bestätigen, wurde auch aus der NS-1 Zelllinie Gesamt-RNA isoliert und in den durchgeführten Northern-Blot Analysen eingesetzt.

Aus 200 ml Medium mit einer Zelldichte von 1×10^5 /ml NS-1 Zellen wurden 4.5 mg Gesamt-RNA isoliert, deren Qualität zwar nicht mit der aus den Asziteszellen vergleichbar war, für eine Northern-Blot Analyse aber durchaus genügte.

2.2. Northern-Blot Analyse der RNAs

2.2.1. Probe für die cDNA der leichten Kette und deren Markierung

Aufgrund der Tatsache, daß ein Antikörper aus zwei identischen schweren und zwei ebenfalls identischen leichten Polypeptidketten aufgebaut ist, mußten separate Proben für deren Identifikation und Klonierung auf Nukleinsäure-Ebene vorhanden sein.

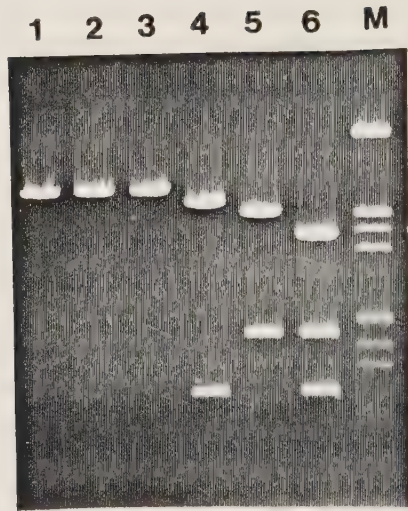
Da die den konstanten Teil der Antikörper kodierenden DNA-Sequenzen gut charakterisiert und zum Teil sequenziert sind, und außerdem der Subklassentyp des bearbeiteten Immunglobulins (aber nicht der Alleltyp) bekannt waren, konnten geeignete DNA-Proben erhalten bzw. synthetisiert werden.

Als DNA-Probe für die leichte Kette stand das Plasmid **pC1** zur Verfügung. Es ist ein pBR322, der die konstante Region einer aus Maus klonierten genomischen Immunglobulin κ leichten Kette als BamHI-HindIII-Fragment enthält (Weischet et al., 1982).

Durch Spaltung mit den Restriktionsenzymen BamHI, HindIII und BglII, sowie Mehrfachspaltungen mit BamHI+BglII, HindIII+BglII und BamHI+HindIII+BglII wurde die Identität von pC1 verifiziert.

Bei Spaltung mit BamHI, HindIII und BglII wurde das Plasmid linearisiert. Bei Mehrfachspaltungen entstanden Fragmente folgender Größe: 1.06 und 6.11 kb (BamHI+BglII), 1.75 und 5.42 kb (HindIII+BglII), sowie 1.06, 1.75 und 4.36 kb (Abb. 3). Diese Restriktionsanalyse entspricht den in der Literatur angegebenen Daten (Weischet et al., 1982).

A



B

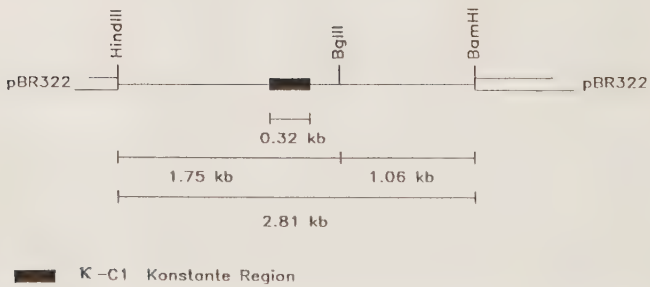


Abb. 3: Identifikation des Plasmids pC1. **A:** Die in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennten Fragmente nach Spaltung mit BamHI (1), HindIII (2), BglII (3), BamHI+BglII (4), HindIII+BglII (5), sowie mit BamHI+HindIII+BglII (6) und λ -III-Längenstandard (M). **B:** Restriktionskarte des Plasmids pC1.

Das 2.81 kb große und Teil der konstanten Region enthaltende HindIII-BamHI-Fragment aus pC1 wurde nach elektrophoretischer Auftrennung im LMP-Agarosegel ausgeschnitten und radioaktiv markiert. Die spezifische Aktivität betrug 5×10^7 cpm/ μ g DNA.

2.2.2. Probe für die cDNA der schweren Kette und deren Markierung

Als Probe für die schwere Kette wurde von Dr. Mertz ein 18 Basen langes Oligodeoxynukleotid synthetisiert.

Die Sequenz des Oligodeoxynukleotids wurde von bereits sequenzierten konstanten Regionen des IgG2a Subklassentyps abgeleitet. Es wurde eine Sequenz ausgewählt, die sowohl zum IgG2a^a - als auch zum IgG2a^b - Allel vollständig komplementär ist. Dies war insofern von Bedeutung, weil zwar die Subklasse des Antikörpers, nicht aber dessen Alleltyp bekannt war. Außerdem sollte das Oligodeoxynukleotid möglichst nahe beim F_{ab} gelegen sein, um es auch als Primer für die Sequenzanalyse des variablen Bereichs verwenden zu können.

Die Anforderungen wurden von den Nukleotidpositionen Nr. 147-130 (Schreier et al., 1981), die im C_H1-Teil der konstanten Region liegen, erfüllt. Die sich daraus ergebende Oligodeoxynukleotidsequenz lautete daher: 5' - ACC ACT GGA CAG GGA TCC - 3' (MM1). Der berechnete Schmelzpunkt T_m liegt bei ca. 58 °C.

150 ng des durch Polyacrylamidgelelektrophorese gereinigten Oligodeoxynukleotids wurde mit γ [³²P]-ATP radioaktiv am 5'-Ende markiert. Die spezifische Aktivität betrug 2.5×10^8 cpm/ μ g Oligodeoxynukleotid.

2.2.3. Northern-Blot Analyse

Jeweils 20 μ g der aus den NS-1- und 6A4-Zellen isolierten RNAs wurden glyoxaliert. Analog wurden 10 000 cpm eines mit ³²P endmarkierten λ -III-Längenstandards behandelt. Die denaturierten RNAs wurden in einem 1.2%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf einen Nylonfilter geblottet. Nach der Vorhybridisierung wurde der Filter mit 4×10^6 cpm (5×10^8 cpm/ μ g) bei 37 °C 16 Std hybridisiert, bei 43 °C gewaschen und autoradiographiert.

Die Autoradiographie zeigt ein starkes Signal bei ca. 2 kb.

Da die schwere Peptidkette eines Antikörpers, einschließlich der Signalsequenz aus ca. 470 Aminosäuren aufgebaut ist, ergibt sich einschließlich der 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche eine Gesamtgröße der mRNA von 1.6 kb (Klein, 1982). Das Ergebnis spricht somit für das Vorhandensein der gesuchten mRNA-Spezies (Abb. 4). Die RNA der NS-1-Zelllinie zeigte kein Hybridisierungssignal (Abb. 4).

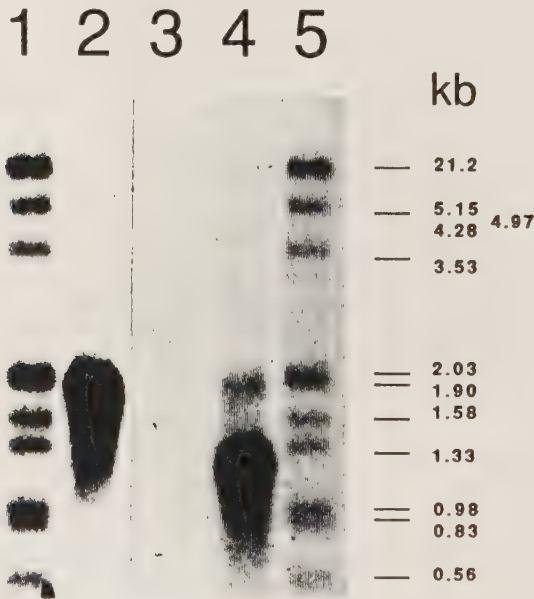


Abb. 4: Northern-Blot Analyse der 6A4- und NS-1-Gesamt-RNA. Signale von 6A4-Gesamt-RNA nach Hybridisierung mit der Probe gegen die schwere bzw. die leichte Kette (2 und 4). Gesamt-RNA der NS-1-Zellen, die nacheinander mit beiden Proben hybridisiert wurde (3). λ -III-Längenstandards mit den Größen der Banden in kb (1 und 5).

Um den gleichen Filter für die Hybridisierung mit der radioaktiv markierten Probe der leichten Kette verwenden zu können, wurde das Oligodeoxynukleotid vom Filter abgewaschen.

Der Filter wurde anschließend 16 Std mit 4×10^6 cpm 5×10^7 cpm/ μ g der Probe für die leichte Kette bei 37 °C hybridisiert, gewaschen und autoradiographiert.

Die Autoradiographie zeigte kein Signal bei der RNA, die aus den NS-1-Zellen isoliert wurde. Ein deutliches Signal, das einer RNA von ca. 1.3 kb entsprach, wurde in der Spur mit

6A4-RNA erhalten (Abb. 4). Dies übertrifft den in der Literatur angegebenen Wert der mRNA-Größe von Immunglobulin K-leichten Ketten um ca. 300 bp (Klein, 1982). Das Ergebnis ist wie im Fall der schweren Kette ebenfalls ein Hinweis auf das Vorhandensein der mRNA, die für die K-leichte Kette kodiert.

2.2.4. Anreicherung der poly(A)+RNA

Aufgrund der vorangegangenen Ergebnisse wurde aus der aus den Asziteszellen isolierten RNA (1.8 mg) durch Chromatographie an oligo dT-Cellulose poly(A)+RNA angereichert.

Aus dem bei OD₂₆₀ gemessenen Wert der 2 x gefällten poly(A)+RNA errechnete sich eine Gesamtmenge von 50 µg. Dies entspricht 2.8% der Gesamt-RNA und deutet auf gut proliferierende, intakte Zellen hin, was auch mit dem Ergebnis der Vitalfärbung in Übereinstimmung steht (C 2.1.).

Nach der letzten Präzipitation wurde die poly(A)+RNA in 25 µl H₂O suspendiert. 1 µl davon (2 µg) wurden durch Elektrophorese in einem 1.2%igem Agarosegel analysiert, um die Qualität beurteilen zu können. Der Rest wurde in 5 µl Portionen aliquotiert und bei -70 °C gelagert.

Wie in Abbildung 5 zu erkennen ist, zeigte die poly(A)+RNA keinen Abbau, und war deshalb für die cDNA Synthese geeignet.

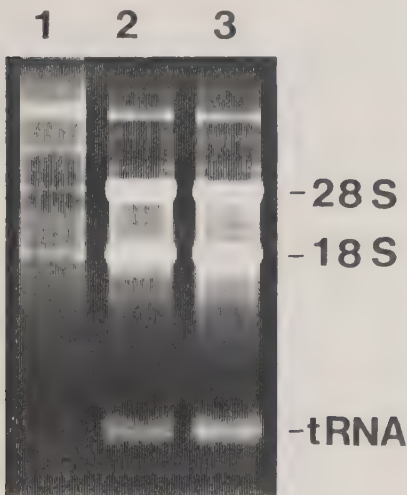


Abb. 5: 2 µg der aus der Gesamt-RNA isolierten poly(A)+RNA (1), 6.5 µg poly(A)-RNA (2) und 6.5 µg des Ausgangsmaterials (3). 28S, 18S und tRNA haben Größen von ca. 4.7 kb, 2.2 kb und 70-120 bp.

3. cDNA-SYNTHESE

3.1. Synthese des ersten und zweiten cDNA-Stranges

Die Synthese des ersten Stranges wurde mit reverser Transkriptase in Gegenwart von Ribonukleaseinhibitor aus humaner Plazenta, die des zweiten Stranges mit *E. coli* DNA Polymerase I in den entsprechenden Puffern durchgeführt. Erster und zweiter Strang wurden separat markiert, d.h. es wurden für jede Probe zwei Reaktionen gestartet, bei welchen nur in der Synthese des ersten Stranges (immer mit A bezeichnet) bzw. nur in der Synthese des zweiten Stranges (immer mit B bezeichnet) Radioaktivität eingesetzt wurde. Als Kontrolle wurde in gleicher Weise parallel Kaninchen Globin mRNA aus Retikulozyten-Polysomen transkribiert.

Nach Ende der Reaktionen des ersten und zweiten Stranges wurde jedem Ansatz 2x2 µl entnommen und zum Messen der cpm auf DE 81 Papier pipettiert. Aus den vom Szintillationszähler erhaltenen Werten der gewaschenen (entspricht der eingebauten Aktivität) bzw. nichtgewaschenen (entspricht der Gesamtaktivität) Papiere ließ sich die prozentuale Einbaurate des radioaktiven α [^{32}P]-dCTP berechnen (Tab. 2).

	cpm		Prozentualer Einbau
	Einbau /	Gesamt	
Globin-A	2 100 /	81 300	2.6%
Globin-B	830 /	45 400	1.8%
6A4-A	424 000 /	7 000 000	6.1%
6A4-B	241 000 /	4 600 000	5.2%

Tab. 2: Einbauraten radioaktiven α [^{32}P]-dCTP's im Vergleich zu nichteingebautem Material. Mit Globin ist die Kontrollsynthese aus Globin mRNA, mit 6A4 die Synthese aus der 6A4-mRNA bezeichnet.

Im Kontrollansatz sind 10 nmole dCTP, im 6A4-Ansatz 25 nmole dCTP enthalten. Mit Hilfe unten aufgeführter Gleichung konnten die Mole synthetisierter cDNA berechnet werden.

Menge der synthetisierten cDNA =

$$= \text{nMole dCTP} \times \frac{\text{cpm eingebautes } \alpha \text{ } [^{32}\text{P}]\text{-dCTP}}{\text{cpm eingesetztes } \alpha \text{ } [^{32}\text{P}]\text{-dCTP}} \times 4 \times 330 \text{ ng/nMol}$$

Anhand der Gleichung und den Werten aus Tabelle 2 wurden für die synthetisierten cDNAs die in Tabelle 3 aufgelisteten Mengen berechnet.

	Menge der cDNA	Prozent bezogen auf mRNA
Globin-A	340 ng	69%
Globin-B	240 ng	48%
6A4-A	1.9 µg	38%
6A4-B	1.7 µg	34%

Tab. 3: Die aus den Einbauraten berechneten Mengen der Synthesereaktionsprodukte (Spalte 1) und deren prozentualer Anteil bezogen auf das Ausgangsmaterial (Spalte 2).

Im Kontrollansatz (Globin-A) wurde der erste Strang effizienter synthetisiert als im 6A4-Ansatz (6A4-A). Beim zweiten Strang ist das Verhältnis umgekehrt. Mögliche Erklärungen sind die unterschiedlichen Konzentrationen an Ausgangsmaterial (25 ng/ml mRNA in den Kontrollen gegenüber 100 ng/ml mRNA in den 6A4-Reaktionen) oder aber unterschiedliche Qualitäten desselben.

Zwecks einer Abschätzung der Länge der synthetisierten cDNAs wurden jeweils 2 µl den Reaktionenansätzen entnommen und nach der Methode für die Elektrophorese von denaturierter RNA glyoxaliert und im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Marker wurde ein ebenso behandelter ³²P-endmarkierter λ-III-Längenstandard eingesetzt.

Die über Nacht exponierten Filme zeigen das in Abbildung 6 zu sehende Muster. Die Transkripte haben Längen zwischen 0.5 und 5 kb für den ersten bzw. 0.3 und 5 kb für den zweiten Strang. Die Kontrollsynthesen der Globin-mRNA ergaben die für sie charakteristischen 0.5 kb langen Produkte in voller Länge.

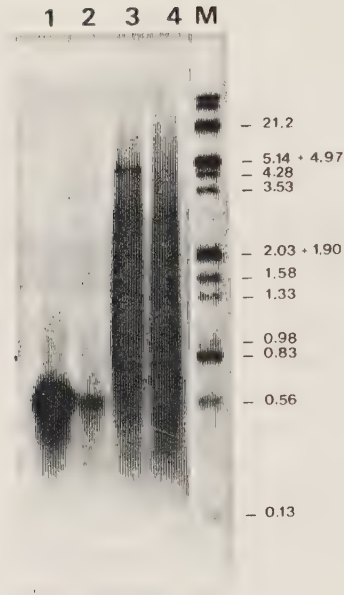


Abb. 6: Autoradiogramm der in Gegenwart von α [^{32}P]-dCTP synthetisierten cDNAs. Links (1 und 2) die Kontrollsynthesen des ersten und zweiten Stranges aus Globin RNA. In Spur 3 und 4 erster bzw. zweiter cDNA-Strang aus 6A4-poly(A)+RNA und λ -III Längenstandard (M).

Die beiden 6A4-cDNAs (6A4-A und 6A4-B, s. Tab. 3) wurden nach der letzten Ethanolpräzipitation in jeweils 25 μl H_2O suspendiert, wodurch cDNA-Konzentrationen von 150 ng/ μl (6A4-cDNA-A) bzw. 140 ng/ μl (6A4-cDNA-B) entstanden.

Die Synthese der 6A4-cDNAs war aufgrund der ermittelten Längen sowie der Menge für alle weiteren Experimente geeignet.

3.2. Modifikation der cDNA-Enden

Die cDNA sollte mit einem PstI gespaltenen, an seinen Enden mit Homopolymer-Schwänzen (Poly G) versehenen pBR322 verknüpft und anschließend in *E. coli* JM109 Zellen

transformiert werden. Die bis an diesem Punkt synthetisierte cDNA hatte glatte Enden. Diese mußten daher in einer durch terminale Desoxynukleotidyl-Transferase katalysierten Reaktion mit Homopolymer-Schwänzen versehen (Poly C₁₀₋₂₀) werden.

Wegen der größeren Menge wurde mit der cDNA aus Synthese A weitergearbeitet. Das Volumen wurde hierfür mit H₂O von 25 auf 50 µl erhöht und auf zwei Eppendorfreaktionsgefäße á 25 µl verteilt. Die Reaktion wurde nach den Angaben im Methodenteil durchgeführt.

3.3. Bestimmung des besten Vektor-cDNA Verhältnisses

Idealerweise sollten in Ligationsansätzen, bei welchen wie in vorliegendem Fall z.B. 0.5 kb bis 5 kb große Inserts in einen 4.36 kb großen Vektor inseriert werden sollen, die molaren Verhältnisse 3 : 1 (poly-dC-cDNA : poly-dG-Vektor) betragen. Dies gilt auch für Annealingreaktionen und hat zur Folge, daß die Molaritäten der verwendeten DNAs mit der entsprechenden Genauigkeit bestimmt werden mußten.

Zwar wurde die Menge der synthetisierten cDNA berechnet, trotzdem konnte die Anzahl der cDNA-Moleküle nur abgeschätzt werden. Dies liegt am Vorhandensein einer nicht kalkulierbaren Zahl kleinerer und kleinster Reaktionsprodukte, von welchen bei der Hochsalzfällung ein nicht berechenbarer Anteil abgetrennt worden ist.

Wegen dieser unbekannten Größe einerseits, und einem kritischem Verhältnis der beiden zu annealenden DNAs andererseits, mußte eine Reihe verschiedener Hybridisierungsansätze gemacht werden, in welchen sich molare Verhältnisse von näherungsweise 1:5 bis 20:1 (poly-dC-cDNA : Vektor) ergaben. Als Vektor wurde ein PstI geschnittener pBR322 mit homopolymeren dG-Schwänzen verwendet (kurz poly-dG-Vektor).

Es wurden acht verschiedene Ansätze durchgeführt (Tab. 4).

Reaktion Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8
poly-dC-cDNA :	1:5	1:2	1:1	2:1	5:1	10:1	20:1	0:1
poly-dG-Vektor (molar)								
H ₂ O	166	77	39	19.5	-	-	-	23.5
10xPuffer	20	10	5	3	-	-	-	3
5xPuffer	-	-	-	-	3	2	1.5	-
poly-dC-cDNA 1.4 ng/μl	4	4	4	4	4	4	4	-
poly-dG-Vektor 25ng/μl	10	-	-	-	-	-	-	-
11.8 ng/μl	-	8	4	2	-	-	-	2
1.18 ng/μl	-	-	-	-	8	4	2	-
Endvolumen	200	99	52	28.5	15	10	7.5	28.5
(Angaben in μl)								
DNA-Konz.	1.3	1.0	1.0	1.0	0.96	0.97	0.98	0.82
[mg/ml]								

Tab. 4: Die zur Bestimmung des besten poly-dC-cDNA : poly-dG-Vektor Verhältnisses angestzten Annealing-Reaktionen. Nr. 1 mit 7 poly-dC-cDNA mit poly-dG-Vektor, Nr. 8 poly-dG-Vektor als Kontrolle.

Die Effizienz der Reaktion wurde durch Transformation äquivalenter Mengen an DNA in kompetente *E. coli* JM109 Zellen und Zählen der Transformanden ausgetestet (Tab. 5). Als Negativ- und Positivkontrolle wurden poly-dG-Vektor (Nr. 8 der Annealingreaktion in Tabelle 4) bzw. nativer pBR322 transformiert.

Ansatz Nr.	Zahl der Trans-formanden	ng transform. DNA	Transformanden pro μg DNA
1	1030	20	52 x 10 ³
2	1065	20	53 x 10 ³
3	460	20	23 x 10 ³
4	1375	20	68 x 10 ³
5	425	15	28 x 10 ³
6	215	10	22 x 10 ³
7	50	7.5	7 x 10 ³
8	310	20	15 x 10 ³
9	254	0.05	5 x 10 ⁶

Tab. 5: Zahl der Transformanden der aus den Hybridisierungsansätzen transformierten DNAs. Die Nr. des Ansatzes entspricht der Nr. der Reaktion in Tab. 4. Nr. 8 und 9 sind die Negativ- (poly-dG-Vektor) bzw. Positivkontrolle (pBR322, nativ).

Die Negativkontrolle (Nr. 8, Tab. 5) führte zu 1.5×10^4 Transformanden. Das bedeutet, daß ca. 20% des Vektors entweder nicht gespalten oder gespalten waren, jedoch keinen poly dG-Schwanz hatten und deshalb religierten.

Das beste Resultat wurde mit Reaktion Nr. 4 erzielt (Tab. 5). In dieser betrug das angenommene poly-dC-cDNA : poly-dG-Vektor Verhältnis 2 : 1 (Tab. 4).

3.4. Annealingreaktion und Transformation der rekombinanten Plasmide in die Wirtszellen

Für die Erstellung einer cDNA - Bank, die die beiden gesuchten cDNAs enthalten sollte, mußte diejenige Menge an cDNA eingesetzt werden, die zur Erzeugung von mindestens 5 000 rekombinanten Klonen führt, da die Häufigkeit der antikörperkodierenden mRNA in Hybridomzellen ca. 0.1 - 0.5% der poly(A)+RNA beträgt (Liu et al., 1984; Buckel et al., 1987; Winnacker, 1984).

Der obige Ansatz Nr. 4 (Tab. 4) wurde hierfür auf ein Endvolumen von 200 µl expandiert. Als Kontrollen für die Qualität des Vektors bzw. als Transformationskontrolle wurden poly-dG-Vektor und nativer pBR322 verwendet (Tab. 6).

Reaktion Nr.	1	2	3	4
poly-dC-cDNA 5.6 ng/µl	170	170	-	-
H ₂ O	-	-	170	170
10xPuffer	20	20	20	20
poly-dG-Vektor 25 ng/µl	10	10	10	-
pBR322 25 ng/µl	-	-	-	10

(Angaben in µl)

Tab. 6: Annealingansätze für die gesamte cDNA-Bank. Nr. 1 und 2 cDNA, Nr. 3 und 4 Kontrollen.

Die DNAs wurden annealed und in kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert. Von Nr. 4 wurde nur ein 1/10 ausplattiert. Die Anzahl der Transformanden ist aus nachfolgender Tabelle ersichtlich.

Ansatz Nr.	Transformanden insgesamt	Transformanden pro µg Vektor-DNA
1	11 x 10 ³	2.5 x 10 ⁴
2	13 x 10 ³	2.5 x 10 ⁴
3	4.5 x 10 ³	1.8 x 10 ⁴
4	2.5 x 10 ⁴	1 x 10 ⁶

Tab. 7: Transformationsausbeute der rekombinanten cDNA-Klone (Nr. 1 und 2), sowie des poly-dG-Vektors (Nr. 3) und des nativen (Nr. 4) pBR322.

Aus der in der Negativkontrolle erhaltenen Anzahl von Transformanden läßt sich errechnen, daß 34% aller Klone keine cDNA-Insertion tragen. Von den 2.4 x 10⁴ Transformanden sind daher 1.3 x 10⁴ rekombinante mit cDNA-Inserts. Es waren also doppelt so viele als die tatsächlich benötigte Anzahl von cDNA-Klonen vorhanden.

4.

SCREENING UND KONSERVIERUNG DER cDNA-BANK

4.1.

Quantifizierung cDNA-enthaltender Klone

Da der Einbau der cDNA in den Vektor dessen β -Lactamase-Gen zerstört, und somit zum Verlust der Ampicillinresistenz von Transformanden führt, wurde das Verhältnis von Ampicillin sensitiven zu Ampicillin resistenten Klonen durch Überimpfen auf Ap- und Tc-enthaltende LB-Platten bestimmt. Transformanden mit cDNA-Insertion sollten daher nur auf Tc-haltigen nicht aber auf Ap-haltigen LB-Platten wachsen.

Durch Minipräparation von DNA, deren Spaltung mit Restriktionsenzymen und Analyse der Spaltprodukte, sollten rekombinante Plasmide und die Größe der in sie eingebauten cDNA nachgewiesen werden.

Von 100 sowohl auf LB/Ap- als auch auf LB/Tc-Platten überimpften Klonen waren 62 Ap^s/Tc^r und 38 Ap^r/Tc^r. Dies stimmt gut mit den in der Transformation erhaltenen Daten überein (vergl. Tab. 7).

Von 24 Ap^s/Tc^r Klonen wurden Plasmid Minipräparationen gemacht und die DNA mit PstI gespalten. Die Spaltprodukte wurden auf einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Auf dem Gel konnten cDNA-Insertionen mit Größen zwischen 50 bp und 2 kb erkannt werden (Abbildung 7).

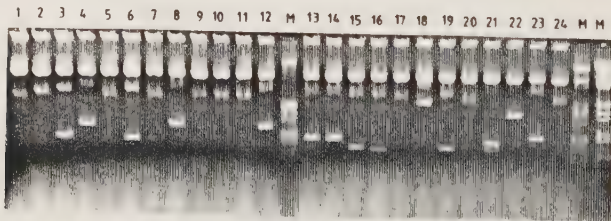


Abb. 7: PstI-Spaltungen von Klonen, bei welchen aufgrund der Ampicillinresistenz eine cDNA-Insertion zu erwarten war. Auf der Fotografie sind in 14 der untersuchten Plasmide Insertionen mit Größen zwischen 50 bp (9) und 2 kb (18) zu erkennen.

In 10 der 24 Plasmide sind augenscheinlich keine cDNA-Insertionen, könnten aber entweder eine sehr kleine (<50 bp) oder aber eine in der Größe der Vektor DNA (4.36 kb) enthalten, wobei letzterer Fall als sehr unwahrscheinlich gilt. Aufgrund der Ap-Sensitivität der untersuchten Klone kann einer der beiden Fälle angenommen werden.

Durch die vorliegenden Daten war das Vorhandensein einer ausreichenden Anzahl cDNA enthaltender Klone gesichert. Somit konnte mit der Suche nach den beiden, die leichte und schwere Kette kodierenden cDNAs, begonnen werden.

4.2. Transfer der Klone in Mikrotiterplatten und auf Nitrocellulosefilter

Insgesamt wurden 8004 Klone in Mikrotiterplatten überimpft, wovon die ersten 4 jeder Platte Hybridisierungskontrollen waren. Napf Nr. 1 enthielt den Wirtstamm *E. coli* JM109, Nr. 2 enthielt JM109 transformiert mit pBR322 (Ap^r, Tc^r), Nr. 3 enthielt JM109 transformiert mit einem Plasmid (Tc^r), das einen Teil der konstanten Region der schweren Kette trägt und Nr. 4 enthielt JM109 mit Plasmid pC1 (Ap^r), das die konstante Region der leichten Kette enthält. Auf jeder Mikrotiterplatte waren somit sowohl zwei Negativkontrollen (Nr. 1 und 2) als auch zwei Positivkontrollen (Nr. 3 für die schwere Kette Nr. 4 für die leichte Kette).

Nach der Inkubation wurden die Kulturen mittels der Stempeltechnik auf Nitrocellulosefilter, die auf tetracyclinhaltigen LB-Platten lagen, überimpft. Nach deren Inkubation wurden die Filter abgenommen, denaturiert und für die Hybridisierung mit Oligodeoxynukleotiden vorhybridisiert.

Die Mikrotiterplatten wurden nach Zugabe von Glycerin bei -70 °C eingefroren.

4.3. Screening nach der cDNA die für die schwere Kette kodiert

Als Probe für die schwere Kette diente das radioaktiv markierte Oligodeoxynukleotid MM1 (6.2×10^6 cpm/pmol).

Die Hybridisierung mit den vorbehandelten Filtern und MM1 (62×10^6 cpm) erfolgte wegen des großen Volumens (175 ml) in einem 500 ml Becherglas mit 10 cm Durchmesser. Nach der Hybridisierung wurden die Filter bei 45 °C gewaschen und bei -70 °C mit Verstärkerfolie autoradiographiert.

Bei den Kontrollen zeigte, wie erwartet, die Nr. 3 ein positives Signal. Von den 8004 Klonen, die auf die cDNA für die schwere Kette getestet wurden, waren 121 positiv. Als Beispiel ist in Abbildung 8 A die Autoradiographie einer der insgesamt 174 Filter zu sehen.

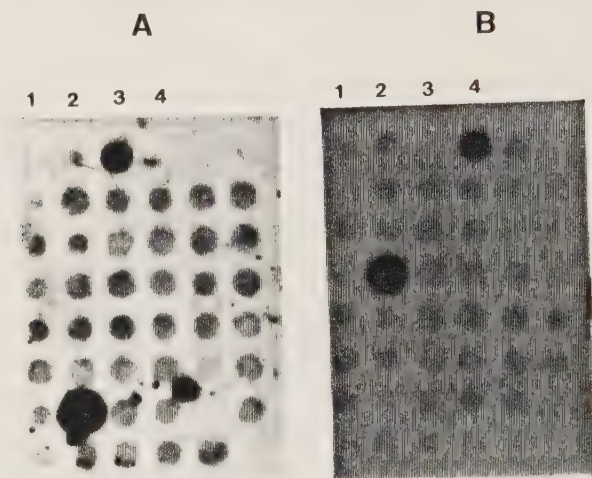


Abb. 8: Zwei der je 174 Autoradiogramme, die nach dem Screening mit der Probe für die DNA der schweren (**A**) und der leichten Kette (**B**) erhalten wurden. Negativkontrollen (1 und 2), Positivkontrolle der schweren Kette (3), Positivkontrolle der leichten Kette (4).

4.4. Screening nach der cDNA die für die leichte Kette kodiert

Um die Klone zu identifizieren, die die cDNA für die leichte Kette enthielten, wurden die vorher verwendeten Filter gewaschen und mit 500 ml Lösung in einem 1 000 ml Becherglas vorhybridisiert.

Hybridisiert wurde mit 12×10^6 cpm des radioaktiv markierten HindIII-BamHI-Fragments aus pC1 (1.2×10^7 cpm/ μ g) in einem 500 ml Becherglas mit 10 cm Durchmesser für 21 Std. Danach wurden die Filter unter Standardbedingungen gewaschen und bei -70°C mit Verstärkerfolie autoradiographiert.

Die Kontrollen entsprachen ihren zu erwartenden Mustern, d.h. nur Kontrolle Nr. 4 zeigte ein positives Signal. Die Anzahl, der mit der Probe für die leichte Kette positiv reagierenden Klone, betrug 327. Abbildung 8 B zeigt als Beispiel die Autoradiographie eines der 174 Filter.

4.5. Charakterisierung der positiv reagierenden Klone

Die insgesamt 448 positiven Klone wurden nochmals von den ursprünglichen Mikrotiterplatten in neue überimpft. Nach der Inkubation wurden sie aus den Mikrotiterplatten mit dem Stempel auf Nitrocellulosefilter übertragen, die sich auf LB/Tc-Platten befanden. Diesmal wurden Doppelfilter angelegt, um echte von falschen Signalen unterscheiden zu können. Die Platten wurden 5 Std inkubiert bevor die Filter abgenommen und denaturiert wurden. Nach der Vorhybridisierung wurde zunächst mit der Oligodeoxynukleotidprobe die mit der Sequenz, die die leichte Kette kodiert, hybridisiert. Nach der Exposition mit dem Film wurden die Filter gewaschen, vorhybridisiert und mit der Probe, die die Sequenz der schweren Kette kodiert, hybridisiert.

Die Anzahl der zuvor positiven Klone reduzierte sich auf von 121 auf 69 (schwere Kette) und von 327 auf 74 (leichte Kette). Das sind, bezogen auf die Gesamtzahl (4 800) der cDNA enthaltenden Klone, 1.4 bzw 1.5%.

4.6. Southern-Blot Analyse der positiven Klone

Von den 143 positiven Klonen wurden 12, die mit der Probe der schweren Kette reagierten und ebensoviele die mit der Probe der leichten Kette reagierten, ausgewählt. Von diesen wurden DNA Minipräparationen angefertigt. Die mit der Restriktionsendonuklease PstI gespaltenen DNAs wurden im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und im Southern-Blot analysiert, wobei die zwei Filter mit den entsprechenden Proben für die DNA der schweren bzw. für die der leichten Kette hybridisiert wurden. Die Autoradiographie der Hybridisierung zeigte für alle Klone im Fall der schweren Kette die Reaktion mit einem Fragment der Größe von ca. 250 bp. Im Fall der leichten Kette wurde - von einer Ausnahme abgesehen - die Reaktion mit einem ca. 1 kb großem Fragment beobachtet (Abb. 9).

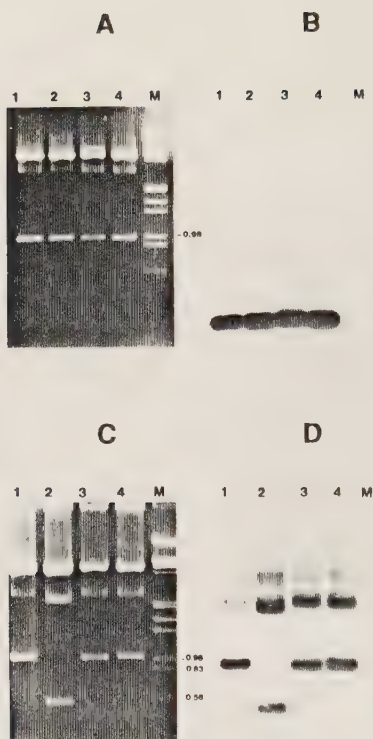


Abb. 9: In **A** sind die PstI-Spaltmuster von vier cDNA-Klonen zu sehen, die beim Screenen mit der Probe für die cDNA der schweren Kette positiv reagierten. **B** ist die Autoradiographie derselben Klone nach Southern-Blot Analyse mit der Probe gegen die schwere Kette. Es hybridisiert ein Fragment von ca. 250 bp. In **C** sind die PstI-Spaltmuster von vier cDNA-Klonen zu sehen, die beim Screenen mit der Probe für die leichte Kette positiv reagierten. **D:** Autoradiographie derselben Klone nach Southern-Blot Analyse mit der Probe gegen die leichte Kette. Es hybridisiert mit einer Ausnahme (2) ein Fragment von ca. 1 kb bzw. 500 bp (2).

Sieben Klone wurden für weitere Versuche ausgewählt. Sie wurden mit pBRL2, pBRL5, pBRL11, pBRL13 (leichte Kette), pBRS1, pBRS7 und pBRS17 (schwere Kette) bezeichnet. Von ihnen wurden größere Mengen Plasmid-DNA präpariert und zur Kontrolle ebenfalls mit PstI gespalten. Das Ergebnis der im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten Spaltungen ist in Abbildung 10 zu sehen.

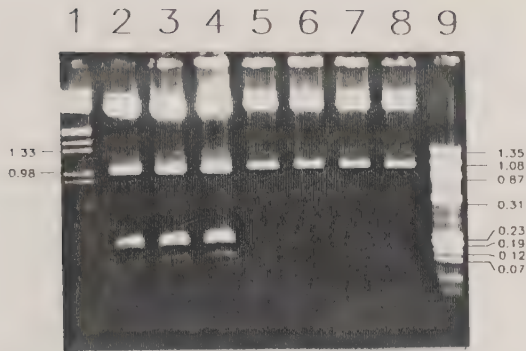


Abb. 10: PstI-Spaltungen der mit den Proben für die cDNAs der schweren und leichten Kette gefundenen positiven Klone. Längenstandard λ -III (1), pBRS1 (2), pBRS7 (3), pBRS17 (4), pBRL2 (5), pBRL5 (6), pBRL11 (7), pBRL13 (8), Φ X 174xHaeIII (9). Für die Klone der schweren Kette sind 6 Fragmente zu erkennen (4.4 kb, 0.9 kb, 0.23 kb, 0.25 kb und 2x50 bp), für die der leichten Kette jeweils nur zwei (4.4 kb und 1.0 kb).

Die Plasmide, die die cDNA der schweren Kette enthalten, werden in 6 Fragmente gespalten, die die cDNA der leichten Kette enthalten in zwei Fragmente. Die cDNAs haben daher - die PstI-Schnittstellen des Vektors berücksichtigt - vier (schwere Kette) bzw. keine (leichte Kette) PstI-Erkennungsstellen.

Mit Hilfe des Längenstandards λ -III ergab die Summe der Fragmente für die cDNA der schweren Kette eine Größe von 1.8 kb, für die der leichten von 1 kb. Dies ist 200 bzw. 300 bp weniger als bei der Northern-Blot Analyse bestimmt wurde (C 2.2.3.). Die Länge der cDNA der schweren Kette ist unter Berücksichtigung des 3'untranslatierten Bereichs trotzdem groß genug, das 460 Aminosäuren lange Peptid vollständig kodieren zu können, was mit 1 kb cDNA für die leichte Kette (230 Aminosäuren) sehr knapp erscheint.

Die Vollständigkeit der kodierenden Sequenzen konnte endgültig nur durch Sequenzanalysen bestimmt werden.

5. DNA - SEQUENZANALYSEN

5.1. Subklonierung und Sequenzanalyse der DNA die für die leichte Kette kodiert

Die Sequenzanalyse sollte, da in der cDNA die notwendigen Restriktionsschnittstellen für die Subklonierung von Fragmenten in der richtigen (ca. 300 bp) Größe nicht enthalten waren, eine Reihe von Deletionsmutanten durch Exonuklease III und Exonuklease VII Behandlung erzeugt werden (Details in E 7.27.).

Da vor der inserierten cDNA keine geeigneten Erkennungssequenzen für die Erzeugung von 5'überhängenden (insertseitig) bzw. 3'überhängenden Enden (vektorseitig) mit den entsprechenden Enzymen gelegen waren, mußte die cDNA-Insertion in ein pUC13-Vektor umkloniert werden.

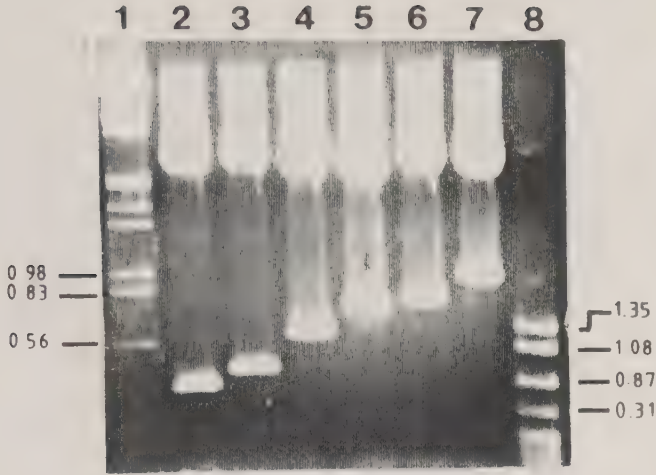
Hierfür wurde pBRL2 mit PstI gespalten und in einem LMP-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Die cDNA-Insertion wurde herausgeschnitten, mit einem PstI-gespaltenen, phosphatasebehandelten pUC13 ligiert und in kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert.

Es wurden Klone erhalten, die das Fragment in unterschiedlichen Orientierungen enthielten. Sie wurden mit pUC13L5 und pUC13L7 bezeichnet.

Vor der Verkürzung der Insert-DNA wurde pUC13L5 mit BamHI (5'-überhängendes proximales Ende) und SacI (3'-überhängendes distales Ende) gespalten. Die so vorbehandelte DNA wurde ExoIII-ExoVII behandelt, rezirkularisiert und in kompetente *E. coli* JM109 Zellen transformiert. Aus 96 Transformanden wurde Plasmid-DNA isoliert und mit PstI und EcoRI gespalten, um die Größe des deletierten cDNA-Inserts zu bestimmen. Die elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel zeigte 25 Klone, deren cDNA-Insertionen verkürzt waren. Von diesen wiederum waren 6 für die Sequenzanalyse geeignet (Abb. 11). Ihre Bezeichnung und Insertgrößen waren wie folgt:

pUC13E14L 360 bp, pUC13E21L 425 bp, pUC13E7L 570 bp, pUC13E12L 680 bp, pUC13E36L 770 bp und pUC13E11L 890 bp (Abb.11).

A



B

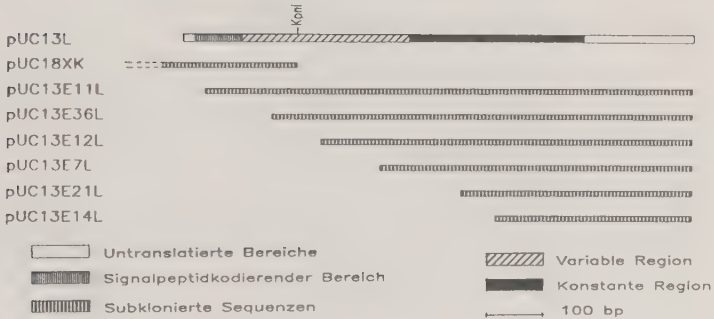


Abb. 11: A: Die im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten EcoRI-PstI-DNA-Spaltungen der Deletionsmutanten. Die unteren Banden (2 bis 7) zeigen jeweils die deletierte, aus dem Vektor herausgespaltene Insertion. λ -III-Längenstandard (1), pUC13E14L (2), pUC13E21L (3), pUC13E7L (4), pUC13E12L (5), pUC13E36L (6), pUC13E11L (7), Φ X-174-Längenstandard (8).
B: Graphische Darstellung der deletierten DNA-Inserts (vertikal schraffiert), bezüglich der undeletierten DNA, sowie Teil eines für die Sequenzieranalyse des Gegenstranges verwendeten Subklons pUC18XK aus pMK.

Die Deletionsmutanten, sowie pUC13L5 und pUC13L7 wurden mit Universalvorwärts- und Rückwärtsprimer sequenziert.

Der Gegenstrang wurde im Bereich der variablen Region analysiert. Beim konstanten Bereich wurde darauf verzichtet und nur ein Strang zur Bestätigung der bereits veröffentlichten Sequenzdaten analysiert (Hamlyn et al., 1981).

Die Sequenzanalyse des Gegenstranges wurde zum Teil in einem Plasmid (pUC18XK) vorgenommen. Dieses enthält das XhoI-KpnI-Fragment aus dem fertigen Expressionsplasmid pM (s. Abb. 23), das Teil der variablen Region von der KpnI-Schnittstelle und das Signalpeptid kodiert. Der für die Sequenzanalyse des Gegenstranges relevante Teil ist in der Graphik der Abbildung 11 **B** dargestellt. Die verbleibende Sequenz wurde mit einem eigens dafür synthetisierten Oligodeoxynukleotid (MM10) als Primer sequenziert.

Eine schematische Darstellung der durchgeführten Sequenzanalysen zeigt Abbildung 12.

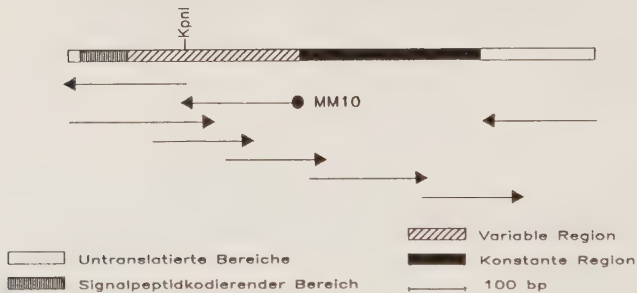


Abb. 12: Schematische Darstellung der Sequenzanalysen für translatierte und untranslatierte Bereiche der cDNA, die die κ -leichte Kette des 6A4-mAK kodiert. Die Pfeile geben Richtung und Länge der jeweiligen Analyse an. Eine der Reaktionen (←•) wurde mit Oligodeoxynukleotid MM10 als Primer durchgeführt.

In Abbildung 13 ist die Autoradiographie eines Sequenzgels zu sehen, die sowohl die während der Klonierung entstandenen homopolymeren ($dG_{(n)}$ und $dC_{(n)}$) Bereiche als auch das Polyadenylierungssignal und das Startkodon beinhaltet.

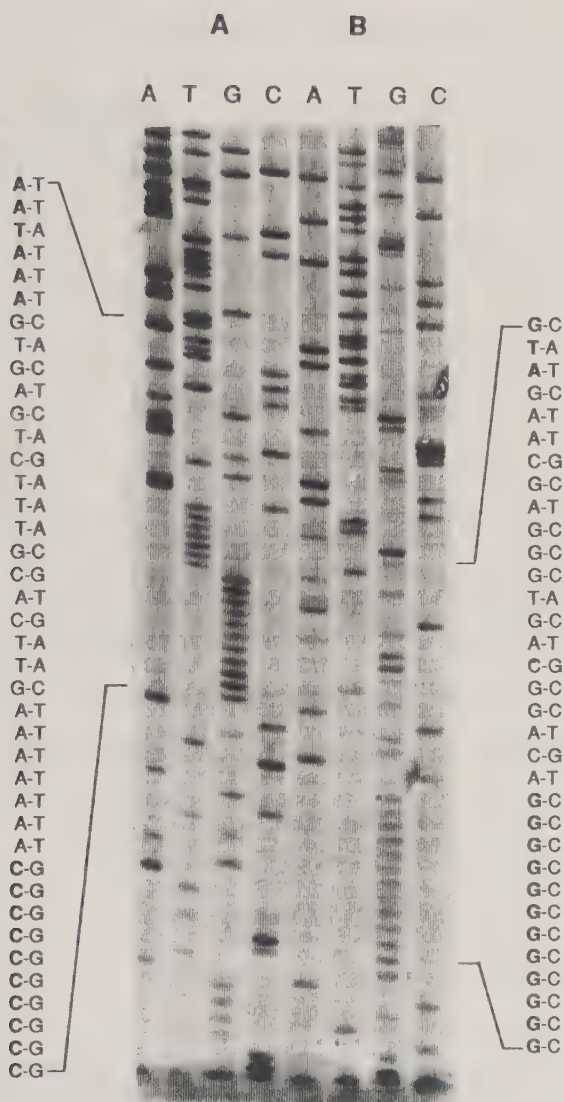


Abb. 13: Autoradiographie eines Sequenzgels. Analyse der Sequenz aus pUC13L5, die für die leichte Kette des 6A4-mAK kodiert: Reaktion mit Vorwärtsprimer (A) und Rückwärtsprimer (B). Zu erkennen sind die Homopolymere (dG und dC), Starkodon (ATG), Polyadenylierungssignal (AATAAA), sowie Teil des poly-A-Schwanzes (alle fettgedruckt).

Die aus den Experimenten gewonnenen Sequenzdaten sind in Abbildung 14 zusammengefaßt.

```

-36   PstI                               •SIGNALSEQUENZ→
    ctgcacgggggggggggggacAGGCAGTGGGAGCAAGATGGATTACAGGCCAGGTTCTT
    1                               MetAspSerGlnAlaGlnValLeu

25   •VARIABLE REGION→
    ATATTGCTGCTGCTATGGGTACTGGTACGTTGGGGACATTGTGATGTCACAGTCTCCA
    9   IleLeuLeuLeuLeuTrpValSerGlyThrCysGlyAspIleValMetSerGlnSerPro

85   TCCTCCCTGGCTGTGTACAGCAGGAGAGAAAGGTCACTATGAGCTGCAATCAGTCAGAGT
29   SerSerLeuAlaValSerAlaGlyGluLysValThrMetSerCysLysSerSerGlnSer

145  CTGCTCAACAGTATAACCCGAAAGAACCTCTTGGCTTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAG
49   LeuLeuAsnSerIleThrArgLysAsnPheLeuAlaTrpTyrGlnGlnLysProGlyGln

205  TCTCCTAAATCGCTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCCTGATCGCTTC
69   SerProLysLeuLeuIleTyrTrpAlaSerThrArgGluSerGlyValProAspArgPhe

265  ACAGGCAGTGGATCTGGGAACAGATTTCACCTCTCACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGAC
89   ThrGlySerGlySerGlyThrAspPheThrLeuThrIleSerSerValGlnAlaGluAsp

325  CTGGCAGTTTATTACTGCAAGCAATCTTATAATCTTCGGACGTTCCGTTGGAGGCACCAAG
109  LeuAlaValTyrTyrCysLysGlnSerTyrAsnLeuArgThrPheGlyGlyGlyThrLys

385  •KONSTANTE REGION→
    CTGGAAATCAAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCACCATCCAGTGAG
129  LeuGluIleLysArgAlaAspAlaAlaProThrValSerIlePheProProSerSerGlu

445  CAGTTAACATCTGGAGGTGCTCTCAGTCGTGTGCTTCTTGAAACAATCTTACTCCCAAGAAC
149  GlnLeuThrSerGlyGlyAlaSerValValCysPheLeuAsnAsnPheTyrProLysAsp

505  ATCAATGTCAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCCTGAACAGTTGG
169  IleAsnValLysTrpLysIleAspGlySerGluArgGlnAsnGlyValLeuAsnSerTrp

565  ACTGATCAGGACAGCAAGAGCAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCCCTCACTGTGACCAAG
189  ThrAspGlnAspSerLysAspSerThrTyrSerMetSerSerThrLeuThrLeuThrLys

625  GACGAGTATGAACGACATAACAGCTATACCTGTGAGGCCACTCACAAGAATCAACTTCA
209  AspGluTyrGluArgHisAsnSerTyrThrCysGluAlaThrHisLysThrSerThrSer

685  CCCATTGTCAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGTAGAGACAAAGGTCCTGAGACGCCAC
229  ProIleValLysSerPheAsnArgAsnGluCysEnd

745  ACCAGCTCCACAGCTCCATCTATCTTCCCTTCTAAGGTCTTGGAGGCTCTCCCAACAAGC

805  GACCTACCACTGTTGCGGTGCTCCAAACCTCCTCCCCACCTCCTTCTCTCTCTCTCTCT

865  TTCCTTGGCTTTTATCATGCTAATATTTGCAGAAAATATTCATAAAGTGAGTCTTTGCA

925  CTTGAAAAAAACccccccccctgcag
        PstI

```

Abb. 14: Nukleotidsequenz der cDNA, die für die leichte Kette des mAK-6A4 kodiert. Die kodierende Sequenz ist fettgedruckt. Die den konstanten Teil der leichten Kette kodierende Sequenz ist unterstrichen. Zu Beginn und am Ende sind die PstI-Erkennungssequenzen (CTGCAG), sowie die während der Klonierungsschritte der cDNA entstandenen poly-dG (G₁₂) bzw. poly-dC (C₁₀) Bereiche. Große Buchstaben kennzeichnen 3' und 5'untranslatierte Regionen. Kleine Buchstaben geben Vektorsequenzen an. Außerdem ist die singuläre KpnI-Erkennungssequenz gekennzeichnet.

5.2. Subklonierung und Sequenzanalyse der DNA die für die schwere Kette kodiert

Die Unklonierung der die schwere Kette kodierenden cDNA als PstI-Fragment in pUC13 war nicht möglich, da die im pBR322 inserierte cDNA 4 PstI-Schnittstellen aufweist (C 4.6.). Für die Sequenzanalyse wurden deshalb subklonierte Fragmente der cDNA in den Reaktionen eingesetzt. Dabei konnte für die den konstanten Bereich der schweren Kette kodierende cDNA auf bereits veröffentlichte Sequenzdaten und die daraus ablesbaren Restriktionsschnittstellen zurückgegriffen werden (Schreier et al., 1981). Für die Analyse des Gegenstranges wurde, wie bereits bei der leichten Kette, nur der den variablen Teil der schweren Kette kodierende Bereich berücksichtigt. Um die den konstanten Teil kodierende Sequenz mit bereits publizierten Daten vergleichen zu können, wurde von derselben nur ein Strang analysiert.

In Abbildung 15 sind die für die Sequenzanalyse subklonierten Fragmente dargestellt. Es sind dies die drei 220, 250 und 941 bp großen, in pUC13 klonierten PstI-Fragmente, sowie das 475 bp große XhoI-SacI- und das 315 bp große SacI-SacI-Fragment. Die beiden letzteren wurden in pUC18 kloniert. Die Bezeichnung der Klone lautet in der gleichen Reihenfolge: pUC13p7S, pUC13p25S, pUC13p13S, pUC18XS und pUC18SS.

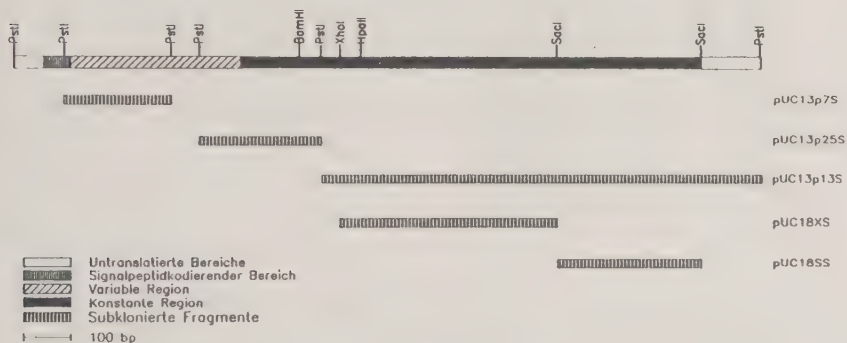


Abb. 15: Die für die Sequenzanalyse subklonierten Fragmente, die für die schwere Kette des 6A4-mAK kodieren. Oben die cDNA mit den für die Subklonierung wichtigen Schnittstellen. Die vertikal schraffierten Balken stellen die klonierten Fragmente dar.

Die Sequenzierung wurde mit Oligodeoxynukleotiden und Universalprimern durchgeführt. Die Oligodeoxynukleotide MM8 und MM9 wurden mit Daten aus der Analyse des Klons pUC13p7S synthetisiert.

MM8 wurde benötigt, um die Sequenzen zwischen pUC13p7S und pUC13p25S zu ermitteln. Diese sind durch 60 - nicht klonierbare - Basenpaare voneinander getrennt.

MM9 wurde synthetisiert, um den Gegenstrang der das Signalpeptid kodierenden und der 5'untranslatierten Region zu analysieren. Außerdem konnten damit auch in diesem Bereich mutagenisierte Sequenzen überprüft werden.

In Abbildung 16 sind die für die schwere Kette des 6A4-mAK kodierende cDNA durchgeführten Analysen schematisch dargestellt.

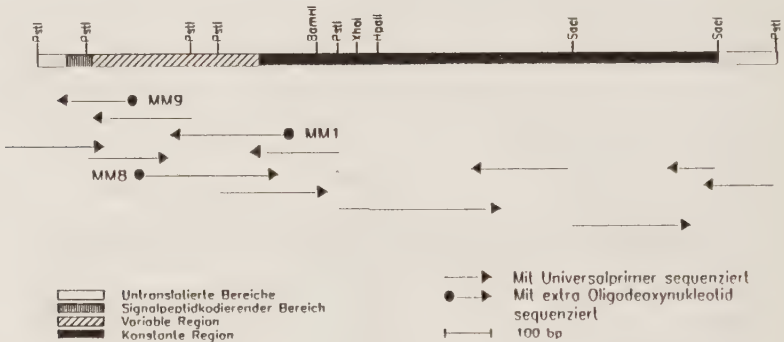


Abb. 16: Schematische Darstellung der Sequenzanalysen für translatierte und untranslatierte Bereiche der die schwere Kette des 6A4-mAK kodierenden cDNA. Die Pfeile geben Richtung und Länge der jeweiligen Analyse an. Drei der Reaktionen (←•) wurden mit Oligodeoxynukleotiden MM9, MM1 und MM8 als Primer durchgeführt.

In Abbildung 17 sind die Autoradiographien markanter Sequenzen der die schwere Kette des 6A4-mAK kodierenden cDNA gezeigt.

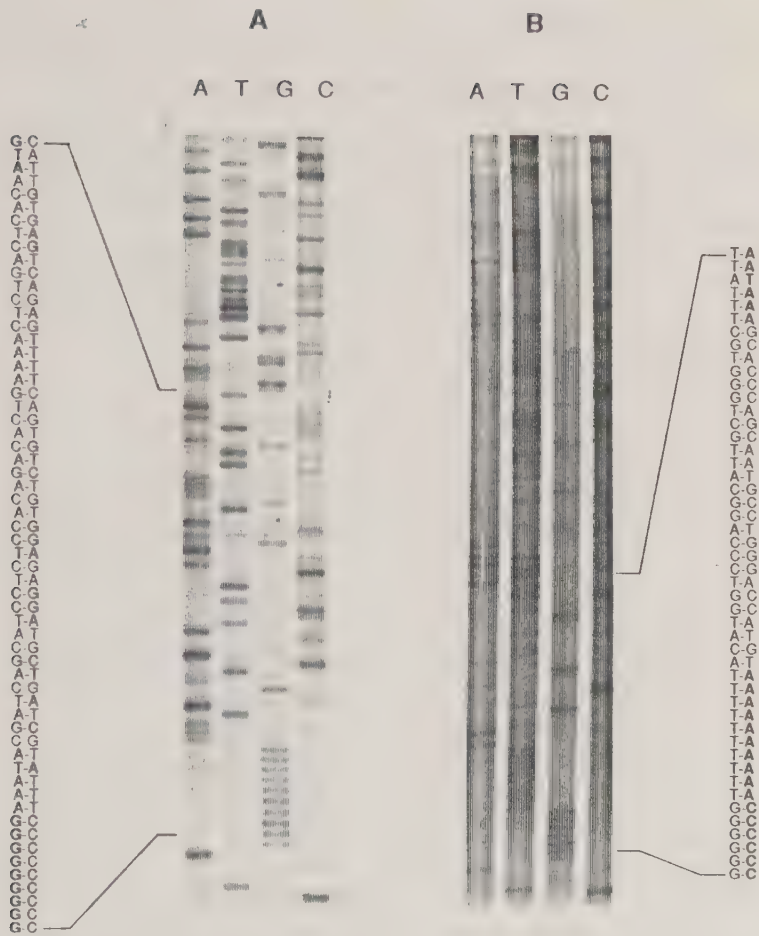


Abb. 17: Autoradiographie eines Sequenzgels, das markante Sequenzen der cDNA, die für die schwere Kette kodiert, zeigt. Zu erkennen sind die Homopolymere (dG und dC) (A und B), Startkodon (ATG) (A), Polyadenylierungssignal (AATAAA)(B), sowie Teil des poly-A-Schwanzes (B).

In Abbildung 18 sind die bei der Sequenzanalyse erhaltenen Daten dargestellt.

```

-63      PstI
      ctgcaggggggggAAATACGATCAGCATCCTCTCCACAGACACTGAAACTCTGACTC

-3      •SIGNALSEQUENZ→
      ACAATGGAAAGGCACCTGGATCTTTCTCTTCCTGTTTTTCAGTTACTGCAGGTGTCCACTCC
1          MetGluArgHisTrpIlePheLeuPheLeuPheSerValThrAlaGlyValHisSer
      PstI

```

•VARIABLE REGION→
 58 CAGGTCACAGCTTCAGCAGCTCGGGGCTGAACTGGCAAACCTGGGGCCCTCAGTGAAGATG
 20 GlnValGlnLeuGlnGlnSerGlyAlaGluLeuAlaLysProGlyAlaSerValLysMet
 118 TCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGCCTACTGGATGCCTGGGTAACACAGAGG
 40 SerCysLysAlaSerGlyTyrThrPheThrAlaTyrTrpMetHisTrpValLysGlnArg
 178 CCTGGACAGGCTCTGGAATGGATTGGATACTTAATCCTAACACTGGTTATCTGTAATACT
 60 ProGlyGlnGlyLeuGluTrpIleGlyTyrIleAsnProAsnThrGlyTyrThrGluTyr
 238 AATCAGAACCTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCCAGACAAATCCTCCAAGCAGACGCTAC
 80 AsnGlnAsnPheLysAspLysAlaThrLeuThrAlaAspLysSerSerSerThrAlaTyr
 298 ATGCAACTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCAGTCTATTATTGTACAAGAAGCTAC
 100 MetGlnLeuSerSerLeuThrSerGluAspSerAlaValTyrTyrCysThrArgSerTyr
 358 TATAACTACGAGGGGGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCAACCGTCTCCTCA
 120 TyrAsnTyrGluGlyAlaMetAspTyrTrpGlyGlnGlyThrSerValThrValSerSer
 •KONSTANTE REGION→
 418 GCCAAACACAGCCCCATCGGTCTATCCAAGTGGCCCGCTGTGTGGAGATACAAGTGGC
 140 AlaLysThrThrAlaProSerValTyrProLeuAlaProValCysGlyAspThrGly
 478 TCCTCGGTGACTCTAGGATGCCCTGGTCAAAGGGTTATTTCCCTGAGCCAGTGACCTTGAC
 160 SerSerValThrLeuGlyCysLeuValLysGlyTyrPheProGluProValThrLeuThr
 538 TGGAACTCTGGATCCCTGTCTCAGTGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTCTGAGTCTGAC
 180 TrpAsnSerGlySerLeuSerSerGlyValHisThrPheProAlaValLeuGlnSerAsp
 598 CTCTACACCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACTCGAGCACCCTGGCCCAAGCAGTCCATC
 200 LeuTyrThrLeuSerSerSerValThrValThrSerSerThrTrpProSerGlnSerIle
 658 ACCTGCAATGTGGCCACCCTGGCAAGCAGCACCAGGTGGACAAGAAAATGAGCCAGAA
 220 ThrCysAsnValAlaHisProAlaSerSerThrLysValAspLysLysIleGluProArg
 718 GGGCCCAACAATCAAGCCCTGTCTCCTCCATGCAAAATGCCCAAGCACCTAACCTCTTGGGTGG
 240 GlyProThrIleLysProCysProProCysLysCysProAlaProAsnLeuLeuGlyGly
 778 CCATCCGCTCTCATCTTCCCTCCAAGATCAAGGATGTACTCATGATCTCCTGAGCCCC
 260 ProSerValPheIlePheProProLysIleLysAspValLeuMetIleSerLeuSerPro
 838 ATAGTCACAATGTGTGGTGGTGGATGTGAGCGAGGATGACCCAGATGTCCAGATCAGCTGG
 280 IleValThrCysValValValAspValSerGluAspAspProAspValGlnIleSerTrp
 898 TTTGTGAACAACGTGGAAGTACACACAGCTCAGACACAAAACCATAGAGAGGATTACAACT
 300 PheValAsnAsnValGluValHisThrAlaGlnThrGlnThrHisArgGluAspTyrAsn
 958 AGTACTCTCCGGTGGTCACTGCCCTCCCCTCCAGCACACAGGACTGGAATGAGTGGCAAAG
 320 SerThrLeuArgValValSerAlaLeuProIleGlnHisGlnAspTrpMetSerGlyLys
 1018 GAGTTCAAATGCAAGGTCAAACAACAAGAAGCTCCAGCGCCCATCGAGAACAACCATCTCA
 340 GluPheLysCysLysValAsnAsnLysAspLeuProAlaProIleGluArgThrIleSer
 1078 AAACCCAAAGGGTCAGTAAAGCTCCACAGGTATATGTCTTGCCTCCACAGAGAAGAAG
 360 LysProLysGlySerValArgAlaProGlnValTyrValLeuProProProGluGluGlu
 1138 ATGACTAAGAAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGACATT
 380 MetThrLysLysGlnValThrLeuThrCysMetValThrAspMetProGluAspIle
 1198 TACGTGGAGTGGACCAACAACGGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACAATGAACAGTCT
 400 TyrValGluTrpThrAsnAsnGlyLysThrGluLeuAsnTyrLysAsnThrGluProVal
 1258 CTGGACTCTGATGGTTCTTACTTCATGTAACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGG
 420 LeuAspSerAspGlySerTyrPheMetTyrSerLysLeuArgValGluLysLysAsnTrp
 1318 GTGGAAAGAAATAGCTACTCTCTGTTCACTGGTCCACGAGGCTGTGCACAATCACCACACG
 440 ValGluArgAsnSerTyrSerCysSerValValHisGluGlyLeuHisAsnHisHisThr
 1378 ACTAAGAGCTTCTCCCGGAAGTCCGGGTAATGAGCTCAGCAGCCACAAAAGTCTCAGGTC
 460 ThrLysSerPheSerArgThrProGlyLysEnd

1438 CAAAGAGACACCCACACTCÂTCTCCATGCTTCCTTGTAÂAATAAAGCÂCCCAGCAATG

1498 CCTGGGACCÂTGTAÂAAAAÂAAAccccccctgcag

Abb. 18: Nukleotidsequenz der cDNA, die für die schwere Kette des mAK-6A4 kodiert. Die translatierte Sequenz ist fettgedruckt. Die den konstanten Teil der schweren Kette kodierende Sequenz ist unterstrichen. Zu Beginn und am Ende sind die PstI-Erkennungssequenzen (CTGCAG), sowie die während der Klonierungsschritte der cDNA entstandenen poly-dG (G9) bzw. poly-dC (C6) Bereiche. Große Buchstaben kennzeichnen 3' und 5'untranslatierte Regionen. Kleine Buchstaben geben Vektorsequenzen an. Außerdem sind die für das charakteristische Spaltmuster mit dem Restriktionsenzym PstI verantwortlichen Erkennungssequenzen, sowie die singuläre BamHI-Erkennungssequenz angegeben.

6. SYNTHIESE DES EXPRESSIONSPLASMIDS

Im folgenden sollte versucht werden ein Plasmid zu konstruieren, welches die cDNA enthält, die für die schwere und die leichte Kette des 6A4-mAK kodiert und die heterologe Expression der beiden Ketten in *S. cerevisiae* ermöglicht.

Während der ersten Versuche heterologe Gene in *S. cerevisiae* zu exprimieren, konnte z.B. für das Kaninchen β Globin zwar die homologe mRNA gefunden werden, sie stimmte aber nicht mit ihrem normalen Zustand überein. Ein verändertes 5'-Ende wies darauf hin, daß der heterologe Promotor der Hefe nicht korrekt benutzt wurde (Beggs et al., 1980). Auch wurden die Introns heterologer Gene nicht zuverlässig entfernt (Langford et al, 1983). Die Effizienz der durch fremde DNA-Sequenzen gesteuerten Expression in *S. cerevisiae* ist im allgemeinen niedrig (Kingsman et al., 1985).

Die Expression sollte daher unter der Kontrolle eines Promotors aus *S. cerevisiae* stehen. Da nicht vorhersehbar war, inwieweit die Expression der heterologen Peptide die Funktionen des Wirtsorganismus beeinträchtigten, sollte er auch induzierbar sein.

Von den bekannten, in Frage kommenden Promotoren wurde derjenige ausgewählt, der sich durch eine bidirektionelle Aktivität auszeichnet, und sich in diesem Merkmal von den meisten anderen unterscheidet. Dies war insofern von Bedeutung, als die beiden cDNA-Sequenzen, die für die Peptide kodieren, simultan ohne Verzögerung induziert werden konnten. Damit könnte unter Umständen die Assoziation der synthetisierten Peptide und somit die Entstehung des Antikörpers gegenüber voneinander unabhängig induzierten Transkriptionen begünstigt werden.

Ein weiterer Aspekt, der bei der Konstruktion berücksichtigt werden sollte, war, daß auch die nicht-translatierten 5'-Leader Sequenzen ihrem ursprünglichem Zustand angepaßt werden sollten.

Bei der heterologen Genexpression in Hefe wurde eine bis zu zehnfache Anhebung der Expressionsrate durch Einfügen einer hefespezifischen Terminationsregion nach einem Strukturgen beschrieben (Choo et al., 1986; Mellor et al., 1983 und 1985). Die kodierenden cDNA-Sequenzen der schweren und leichten Kette sollten daher mit homologen Terminationssignalen versehen werden.

Da das Plasmid in Hefe replikationsfähig sein sollte, mußte es einen Replikationsursprung sowie einen Selektionsmarker enthalten. Aus technischen Gründen galt diese Forderung ebenso für *E. coli*, in welchem die Klonierungsschritte und Vermehrung der Plasmide vorgenommen wurden.

6.1. Vorgehensweise und Durchführung der Klonierung

Als Ausgangsmaterial standen die zu vereinigenden Sequenzen in einer Reihe von Vektoren zur Verfügung. Sie sind mit allen anderen verwendeten Plasmiden und den dazugehörigen wichtigsten Daten in einer Übersicht im Anhang zusammengefaßt.

Durch Isolieren der Fragmente und deren Zusammenbau entstanden, bedingt durch die Lage der Erkennungs- und Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen, unerwünschte Sequenzabschnitte zwischen Promotor und den beiden Strukturgenen. Diese haben möglicherweise einen auf die Expression nicht vorhersehbaren und zudem schwierig nachzuweisenden Einfluß. Es wurde deshalb versucht, ein auf die essentiellen Sequenzen beschränktes Konstrukt zu erstellen, das vor allem an den Verknüpfungsstellen dem Zustand der Sequenz in ihrer natürlichen Konfiguration in *S. cerevisiae* möglichst nahe kommt.

Zunächst seien die verwendeten Bestandteile, die für den Zusammenbau des Expressionsplasmids benötigt wurden, aufgezählt. Es handelt sich im Einzelnen um:

- die cDNA aus pUC13L7, die für die leichte Kette des 6A4-mAK kodiert
- die cDNA aus pBRS1, die für die schwere Kette des 6A4-mAK kodiert
- den GAL1-10 Promotor aus pGALCEN3⁻
- den Actin-Terminator aus pg355,
- den ADH-Terminator aus pAAH5 und

• den Shuttlevektor pEMBLyE31

Um die Klonierungsstrategie besser zu veranschaulichen, wurden die cDNAs, die für die schwere und die leichte Kette kodieren, willkürlich in zwei mit A und B bezeichnete Hälften unterteilt und als solche bezeichnet. Die Trennung der schweren Kette in A und B ist durch die singuläre BamHI- Schnittstelle, die der leichten Kette durch die ebenfalls singuläre KpnI- Schnittstelle charakterisiert. Der mit A bezeichnete Teil enthält in beiden Fällen den N-Terminus kodierenden Teil der cDNA, der mit B bezeichnete den Carboxy-Terminus kodierenden Teil (Abb. 19).

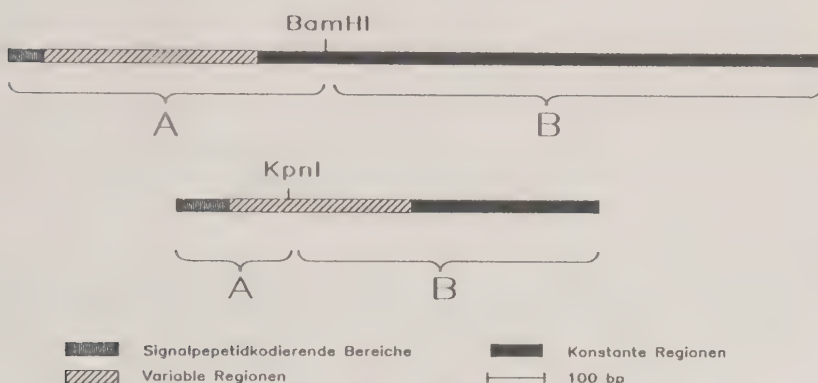


Abb. 19: Die mit A und B bezeichneten Teile der beiden die schwere (oben) und die leichte (unten) Kette des mAK-6A4 kodierenden cDNAs.

Die Klonierungsstrategie bestand darin, die Teile A der die beiden Ketten des mAK-6A4 kodierenden cDNAs links- und rechtsseitig mit dem Promotor zu verknüpfen und für Mutagenesen in einen M13-Vektor umzuklonieren. Nach gezielten Mutagenesen konnten die beiden durch den Promotor verbundenen A-Teile als Fragment mit den beiden zuvor mit Terminatoren versehenen B-Teilen und dem Vektor ligiert werden.

Für die Klonierung war es notwendig einige Zwischenklonierungsschritte vorzunehmen. Sie wurden ohne Ausnahme in dem Bakterienstamm *E. coli* JM109 durchgeführt. Korrekturen von Sequenzen (Deletionen, Insertionen, Austausch) wurden im M13-System durch gezielte Mutagenese mit Oligodeoxynukleotiden ausgeführt.

6.2. Verknüpfung des *GALI-10* Promotors mit den cDNAs die für schwere und leichte Kette des 6A4-mAk kodieren

6.2.1. Verknüpfung des *GALI-10* Promotors mit der cDNA die für die leichte Kette kodiert

Zwar gibt es in *S. cerevisiae* keine Konsensussequenz für Promotoren, dafür aber charakteristische Bereiche wie die TATA-Box (Struhl, 1981) und ein pyrimidinreicher Abschnitt (CT-Block) (Dobson et al., 1982). Beide sind notwendige Elemente einer effizienten Expression. Sie sind in dem hier verwendeten *GALI-10* Promotor enthalten.

Der *GALI-10* Promotor ist ein bidirektionell arbeitender, durch Galaktose induzierbarer Promotor aus *Saccharomyces cerevisiae*.

GALI ist das Gen für Galaktokinase, *GALI0* das Gen für Diphosphoglucose-4-Epimerase (Oshima, 1982). Der Promotor zeichnet sich dadurch aus, daß er durch Glukose im Kulturmedium reprimiert wird und durch Galaktose induziert werden kann, wobei die Expressionsrate der unter seiner Kontrolle stehenden Gene bei Induktion um den Faktor 1 000 erhöht wird (Johnston und Davis, 1984).

Die reprimierende Eigenschaft der Glukose ist sehr hoch. 0.05% (G/V) Glukose im Kulturmedium senken die Expressionsrate um mehr als 60% (Adams, 1972), was bei der Vorgehensweise und Wahl der Galaktose berücksichtigt werden muß. Die meisten käuflichen Qualitäten enthalten nämlich mehr als 0.1% Glukose, nur wenige der bekannten Chemikalienhersteller liefern den benötigten Reinheitsgrad. Die in den Experimenten verwendete Galaktose enthielt weniger als 0.01% Glukose (von Sigma).

Der Promotor lag in einem von Chris Greer (Irvine) stammenden pBR322-Konstrukt (pGALCEN3⁻), zusammen mit der CEN3-Sequenz vor und konnte als 681 bp großes EcoRI-BamHI-Fragment bei der Klonierung verwendet werden.

In den mit den Restriktionsendonukleasen EcoRI und BamHI geschnittenen pUC13L7 wurde das mit den gleichen Enzymen herausgeschnittene *GALI-10* Promotorfragment aus pGALCEN3⁻ inseriert. Das entstandene Plasmid wurde mit pUC13LG (pUC13₂, leichte Kette kodierende cDNA, *GALI-10* Promotor) bezeichnet (Abb. 23, Schritt 2).

6.2.2. Verknüpfung der cDNA die für die schwere Kette kodiert mit dem *GALI-10* Promotor und Teil A der cDNA die für die leichte Kette kodiert

Der nächste Schritt der Klonierung bestand darin, das EcoRI KpnI Fragment aus pUC13LG in pBRS1 zu klonieren. Hierfür mußte in pBRS1 eine geeignete Schnittstelle generiert werden. Dazu wurde in pBRS1 zwischen die EcoRI und ClaI Schnittstellen das 651 bp große, den Polylinker enthaltende, EcoRI-ClaI Fragment aus M13mp18 inseriert (pBRS1mp18, Abb. 23, Schritt 3).

In den mit EcoRI und KpnI geschnittenen pBRS1mp18 wurde das 1673 bp große EcoRI-KpnI-Fragment aus pUC13LG inseriert, welches *GALI-10* und Teil A, der die leichte Kette des 6A4-mAK kodierenden cDNA enthält (Abb. 23, Schritt 4). Dadurch entstand pBRSGL.

6.3. Restaurierung der nicht-translatierten *GALI* und *GALI0*-Leader-Sequenzen vor den 6A4-mAK-Strukturgenen

Um die notwendigen Deletionen ungewünschter Vektorbereiche zwischen den beiden Strukturgenen und dem Promotor durchführen und gleichzeitig Nukleotide austauschen zu können, mußte die entsprechende Region in eine M13-Phagen-DNA umklont werden.

Aus pBRSGL wurde das 2365 bp große XhoI-KpnI-Fragment in eine mit SalI und KpnI geschnittene M13mp19 DNA ligiert. (M13mp19SGL, Abb. 23, Schritt 5),

Die Übergänge an den beiden Restriktionsschnittstellen sollten bei der Deletion der zwischen dem Promotor und den Startkodons gelegenen Sequenzen in ihren ursprünglichen Zustand, wie er in *S. cerevisiae* vorzufinden ist, zurückmutiert werden, d.h., die Startkodons der schweren und leichten Kette kodierenden cDNAs sollten, entsprechend den Startkodons von Galaktokinase bzw. Epimerase, vor dem *GALI-10* Promotor liegen.

Bei der Mutagenese mußten hierfür neben der Deletion zusätzlich 6 bzw. 5 Nukleotide in den 5' nicht-translatierten Sequenzen ausgetauscht werden (Abb. 20).

B

- a.) GAL10-GAL1-----AAGGAGAAAAAA CTATA-----ATG-----Galaktokinase
b.) GAL10-GAL1-----AAGGAGAAAAAA GGATC-(54 Nt)-ATGGATTACAG-Leichte Kette
c.) MM4, 29mer: 3' TTCCTCTTTTTT GATAT-----TACCTAAGTGTC 5'
 $T_m \approx 30^\circ\text{C}$
d.) GAL10-GAL1-----AAGGAGAAAAAA CTATA-----ATGGATTACAG-Leichte Kette
 $T_m \approx 34^\circ\text{C}$

a.) Die Sequenzen zwischen Promotor und Strukturgen (Epimerase-*GAL10-GAL1*-Galaktokinase), wie er in *S. cerevisiae* vorzufinden ist.
b.) Sequenz vor der Mutagenese.
c.) Das Oligodeoxynukleotid mit welchem im betreffenden Fall mutagenisiert wurde. Unterstrichen sind die hybridisierenden Sequenzen; nicht unterstrichen sind Sequenzen die ausgetauscht wurden. T_m sind die theoretischen Schmelzpunkte der hybridisierenden Abschnitte.
d.) Die nach der Mutagenese angestrebte Sequenzkonfiguration.

Bei der Mutagenese mit MM5 (direkte Verknüpfung der schweren Kette mit *GallIO*-Promotor und der *GALIO* 5'-Leader-Sequenz) konnten beim Plaque-Screening keine positiven Mutanten gefunden werden. Deshalb wurde das zu deletierende Stück verkürzt, in der Annahme, daß dadurch die Reaktion günstig beeinflußt werden könnte. Hierzu wurde ein 440 bp großes Fragment durch Spaltung mit den beiden Enzymen AatII und ScaI aus M13mp19SGL herausgeschnitten und die versetzten DNA-Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt (Abb. 21). Die dabei entstandenen glatten Enden wurden ligiert. Die durch die Mutagenese zu deletierende Sequenz wurde dabei von 750 auf 310 bp reduziert (Abb. 21). Die Mutagenesen wurden zunächst mit MM4 und dann mit MM5 durchgeführt (Abb. 21).

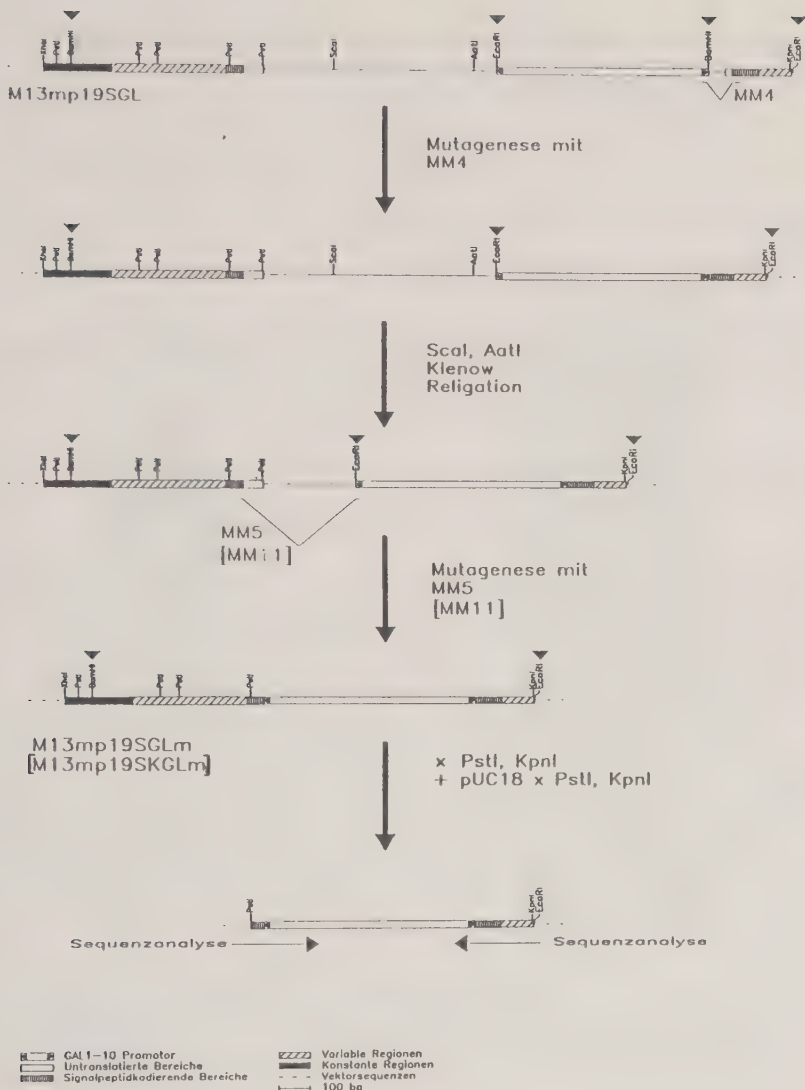


Abb. 21: Schematische Darstellung der Mutagenese der Promotor-Strukturen Verknüpfungen. Nach der Mutagenese von M13mp19SGL mit MM4 (leichte Kette kodierende Region - Promotor) wurde das 440 bp große Scal-AatI-Fragment deletiert. Das religierte Plasmid wurde nach Transformation und Präparation von ssDNA mit MM5 (schwere Kette kodierende Region - Promotor) mutagenisiert. Aus der mit MM4 und MM5 mutagenisierten und mit M13mp19SGLm bezeichneten M13-DNA wurde das 913 bp große PstI KpnI-Fragment für Sequenzanalysen in einen ebenso geschnittenen pUC18 umklont.

Wegen der relativ niedrigen Schmelzpunkte (T_m) der Oligodeoxynukleotide mit den betreffenden komplementären Sequenzabschnitten wurden in den Mutageneseexperimenten stets drei Temperaturen während der Synthese des zweiten Stranges gewählt, nämlich 15 °C, RT und 37 °C. Die Inkubationstemperatur von 37 °C, obwohl 3 °C über der höchsten und 7 °C über der niedrigsten Schmelztemperatur liegend, erwies sich in der Praxis als die beste. Die Anzahl der bei der Hybridisierung erhaltenen positiven Plaques betrug zwischen 2% (MM5) und 10% (MM4). Das nach den Mutagenesen erhaltene Plasmid wurde mit **M13mp19SGLm** bezeichnet (Abb. 23, Schritt 6).

6.4. DNA-Sequenzanalyse der mutagenisierten Regionen

Zum Nachweis der nukleotidgenauen Mutagenese wurden zunächst Klone ausgewählt, die die entsprechenden Deletionen aufwiesen, bzw. Restriktionsschnittstellen verloren hatten.

Nach der Mutagenese von M13mp19SGL mit MM4 bedeutet dies den Verlust von 54 bp und einer der beiden BamHI-Schnittstellen. Bei der Mutagenese mit MM5 sollten 310 bp und eine der zwei EcoRI-Schnittstellen deletiert worden sein. (Abb. 21).

Von positiven Plaques der ersten Mutagenese mit MM4 wurden Einzel- und Doppelstrang-DNA Minipräparationen angefertigt. Die dsDNA wurde mit EcoRI und BamIII gespalten. Statt zwei EcoRI und zwei BamIII Schnittstellen wurden neben den beiden BamIII, nur noch eine EcoRI Schnittstelle gefunden. Dies war ein Hinweis darauf, daß die Mutagenese erfolgreich durchgeführt worden war.

Bei der Mutagenese mit MM5 wurden 310 bp und die EcoRI Schnittstelle des GAL1-10 Promotors deletiert. Die Restriktionsspaltung mit EcoRI, BamIII zeigte den Verlust der EcoRI Schnittstelle und der 310 bp.

Die Analyse durch Sequenzierung wurde nach Umklonierung des 913 bp PstI KpnI-Fragments aus M13mp19SGLm in einen mit denselben Enzymen geschnittenen pUC18 mit Universalprimern durchgeführt.

Die Sequenzen der entsprechenden Stellen in Abbildung 22 zeigen, daß durch die Mutagenese die beabsichtigten Veränderungen in den Sequenzen erzeugt worden waren.

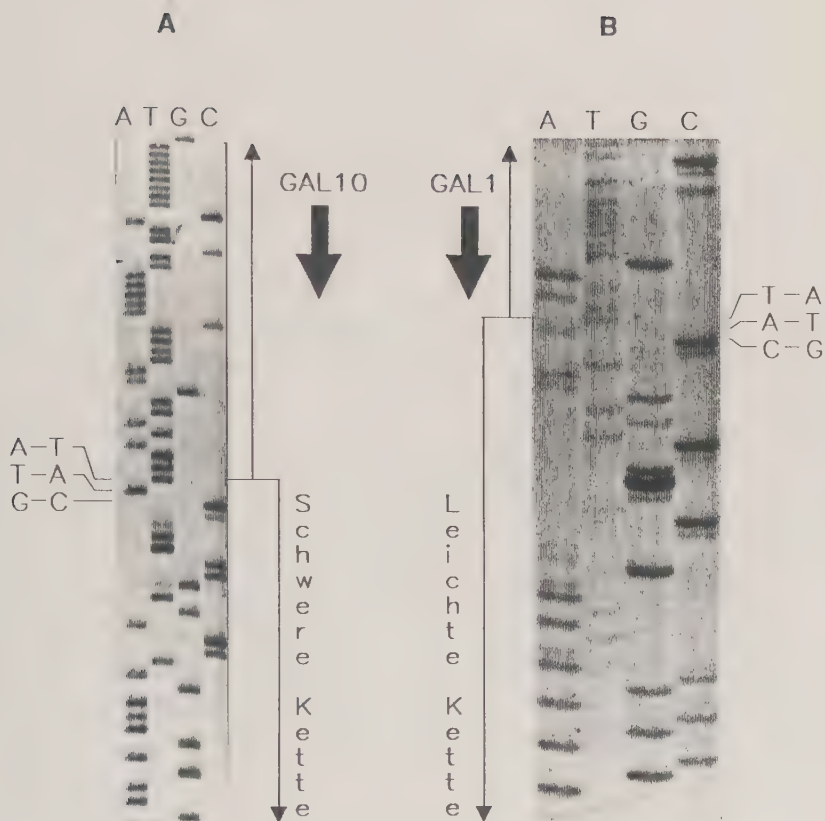


Abb. 22: Sequenzanalyse der Verknüpfungen zwischen Promotor und den Startkodons der schweren (A) bzw. der leichten Kette (B).

6.5. Einbau der Hefe-Terminatoren

6.5.1. Einbau des Actin-Terminators an Teil B der cDNA die für die schwere Kette kodiert

Wegen der bereits diskutierten Erhöhung der Expressionsrate heterologer Gene in *S. cerevisiae*, wenn diese mit homologen Terminationssignalen versehen werden, wurde der entsprechende Bereich des Actin-Gens aus *S. cerevisiae* an das 3'-Ende der cDNA, die für die schwere Kette kodiert, angefügt.

Teil B der schweren Kette mußte als BamHI-SacI-Fragment aus pBRS1 kloniert werden. Da die cDNA, die für die schwere Kette kodiert, eine zweite SacI Schnittstelle enthält, konnte das Fragment nur nach einer SacI-Partialsplaltung isoliert werden.

Zunächst wurde das Plasmid pBRS1 vollständig mit BamHI linearisiert. Anschließend wurde die Partialsplaltung mit SacI durchgeführt, die Fragmente in einem LMP-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das 866 bp große BamHI-SacI-Fragment mit dem Actin-Terminator aus pg355 (SacI-HindIII-Fragment) und pUC18 (BamHI-HindIII geschnitten) ligiert (Abb. 23, Schritt 7). Das Konstrukt wurde mit **pUC18TS** bezeichnet.

6.5.2. Einbau des ADH-Terminators an Teil B der cDNA die für die schwere Kette kodiert

Um die Rekombination zweier homologer Terminatoren zu verhindern, wurde für die leichte Kette eine andere Sequenz, nämlich die des ADH (Alkohol Dehydrogenase)-Terminators aus *S. cerevisiae* gewählt.

Die Sequenz lag als 450 bp großes HindIII-BamHI-Fragment in einem mit pAAH5 bezeichnetem Plasmid (von Ben Hall, Seattle) vor.

Aus pUC13L7 wurde das 230 bp HindIII-KpnI-Fragment mit dem ADII-Terminator (HindIII-BamHI-Fragment) aus pAA115 in einen mit KpnI und BamHI geschnittenen pUC18 ligiert, wodurch das Plasmid pUC18TL entstand (Abb. 23, Schritt 8).

6.6. Fertigstellung des Expressionsplasmids pM

Aus M13mp19SGLm wurde das 1405 bp große BamIII-KpnI-Fragment (Teil A der schwere Kette kodierenden cDNA, Promotor, Teil A der leichte Kette kodierenden cDNA) in den mit den gleichen Enzymen gespaltenen pUC18TS (Teil B der schwere Kette kodierenden cDNA, Actin-Terminator) inseriert (Abb. 23, Schritt 9). Das resultierende Plasmid wurde mit pUC18TSGL bezeichnet.

Für die Klonierung in *E. coli* und die Expression in *S. cerevisiae* wurde ein Vektor benötigt, der in beiden Organismen replikationsfähig ist und entsprechende Selektionsmarker trägt. Beide Bedingungen erfüllt pFMBLYe31: Für Replikation und Selektion in *E. coli* trägt er den *ORI* (origin of replication) und das β -Lactamase-Gen (Ap^r). In *S. cerevisiae* erfüllen $2\mu m$ und das *LEU2* Gen die gewünschten Funktionen. Der Vektor ist 8 098 bp groß.

Der Vektor wurde ausgewählt, weil eine hohe Expressionsrate während einer kurzen Fermentationszeit erwünscht war. Dies wird durch hohe Kopienzahl des Vektors erreicht (Kingsman et al., 1985). Diese Eigenschaft wird durch das $2\mu m$ Element, das in pEMBLYe31 enthalten ist, vermittelt (Broach, 1982; Hartley und Donelson, 1980).

Die bis hier beschriebenen Klonierungen wurden als Ausgangsmaterial für den Zusammenbau des vollständigen Expressionsplasmids benutzt.

Als letzter Klonierungsschritt wurden die Fragmente KpnI-HindIII aus pUC18TSGL und Sall-KpnI aus pUC18TL mit Sall und HindIII gespaltenen Vektor pEMBLYe31 mitverknüpft (Abb. 23, Schritt 10).

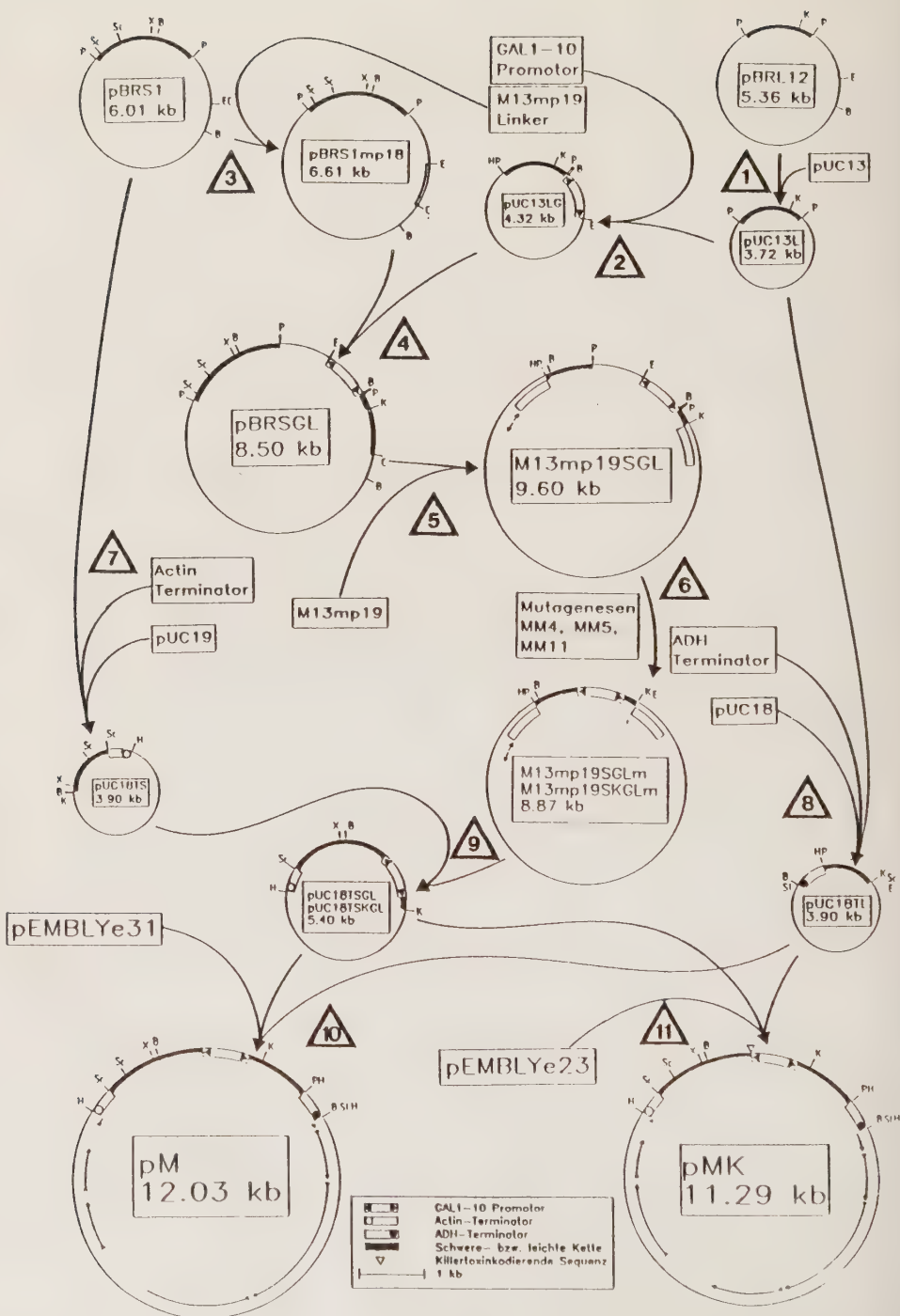


Abb. 23: Klonierungsschema der beiden die leichte und die schwere Kette des Antikörpers kodierenden cDNAs in das Expressionsplasmid. Die Plasmide sind maßstabsgetreu dargestellt. Restriktionsschnittstellen sind nur insoweit eingetragen, als sie für die Klonierung von Bedeutung waren. Die in den Dreiecken eingefassten Zahlen bedeuten im Einzelnen:

- 1: pBRL2 x PstI ∞ pUC13 x PstI $\rightarrow$ pUC13L ;
- 2: pUC13L x EcoRI+BamHI ∞ *GAL1-10* Promotor (EcoRI+BamHI) $\rightarrow$ pUC13LG;
- 3: pBRS1 x EcoRI+ClaI ∞ mp18-Linker (EcoRI+ClaI) $\rightarrow$ pBRS1mp18;
- 4: pBRS1mp18 x EcoRI+KpnI ∞ pUC13LG x EcoRI + KpnI $\rightarrow$ pBRSGL;
- 5: pBRSGL x XhoI+KpnI ∞ M13mp19 x SalI+KpnI $\rightarrow$ M13mp19SGL;
- 6: Mutagenesen mit MM4, MM5 $\rightarrow$ M13mp19SGLm;
- [6: Mutagenesen mit MM4, MM11 $\rightarrow$ M13mp19SKGLm]
- 7: pBRS1 x BamHI+(SacI partial) ∞ Actin-Terminator x SacI+HindIII x ∞ pUC19 x BamHI+HindIII $\rightarrow$ pUC18TS;
- 8: pUC13L x HindIII+KpnI ∞ ADH-Terminator x HindIII+BamHI x ∞ pUC18 x KpnI+BamHI $\rightarrow$ pUC18TL;
- 9: pUC18TS x BamHI+KpnI ∞ M13mp19SGLm x BamHI+KpnI $\rightarrow$ pUC18TSGL;
- [9: pUC18TS x BamHI+KpnI ∞ M13mp19SKGLm x BamHI+KpnI $\rightarrow$ pUC18TSKGL;]
- 10: pEMBLYe31 x SalI+HindIII ∞ pUC18TL x SalI+KpnI ∞ pUC18TSGL x KpnI+HindIII $\rightarrow$ pM;
- [11: pEMBLYe23 x SalI+HindIII ∞ pUC18TL x SalI+KpnI ∞ pUC18TSKGL x KpnI+HindIII $\rightarrow$ pMK;]

x = Gespalten mit Restriktionsendonuklease;

∞ = durch Ligationsreaktion miteinander verknüpft;

$\rightarrow$ = Produkt der Reaktion;

[] = Schritte, die zur Erzeugung von pMK durchgeführt wurden;

Die Buchstaben stehen für Restriktionsendonukleasen, und bedeuten im Einzelnen: B=BamHI; C=ClaI; E=EcoRI; H=HindIII; K=KpnI; P=PstI; Sc=SacI; Sl=SacI; X=XhoI; Es sind nur die für die Klonierung wichtigsten Spaltstellen angegeben.

Zur Überprüfung, ob das Expressionsplasmid alle eingesetzten Teile enthält, wurde es mit den Restriktionsenzymen HindIII+SalI, BamHI+KpnI, BamHI, HindIII, sowie PstI gespalten. Die erhaltenen Spaltmuster sind in Abbildung 24 zu sehen.

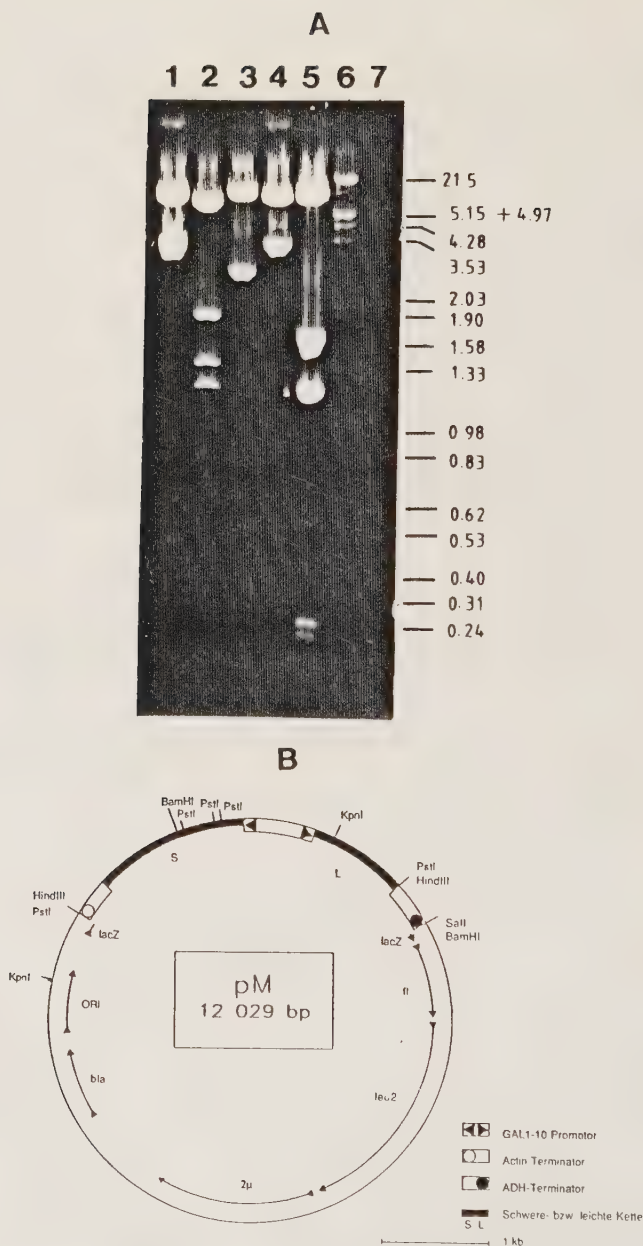


Abb. 24: A: Analyse des Expressionsplasmids durch Spaltungen mit den Restriktionsenzymen HindIII und Sall (1), BamHI und KpnI (2), BamHI (3), HindIII (4), PstI (5). Längenstandards λ III (6) Φ X 174 (7). **B:** Graphische Darstellung des Expressionsplasmids.

7. EXPRESSIONSVERSUCHE

7.1. Transformation des Expressionplasmids in *S. cerevisiae*

Für die Expression wurde der Hefestamm *S. cerevisiae* F808 mit dem Plasmid pM und dem Shuttlevektor pEMBLyE31 ohne Insertion als Kontrolle transformiert. Von beiden Plasmiden wurde jeweils 5 µg DNA für die Transformation eingesetzt.

Es wurden 23 pM (mit YpM bezeichnet) und 45 pEMBLyE31 (mit YpEM31 bezeichnet) transformierte Kolonien erhalten.

7.2. Kultivierung der Zellen unter promotorinduzierenden und -nichtinduzierenden Bedingungen

Von den transformierten Hefen wurden zwei (YpEM31 und YpM) parallel in Leucin-freiem Minimalmedium unter den im Methodenteil beschriebenen Bedingungen gezüchtet und für die Expression der Polypeptide induziert. Außerdem wurden von ihnen Kulturen unter nichtinduzierenden Bedingungen angelegt. Bei diesen wurde der Wechsel der C-Quelle von Glukose auf Galaktose nicht durchgeführt, um feststellen zu können, inwieweit die Induktion des Promotors das Wachstum der Zellen beeinflusst. Das Wachstum wurde durch Messen der OD₆₀₀ zu definierenden Zeitpunkten bestimmt (Tab. 10).

Std nach Inokulation	Nichtinduziert		Induziert	
	YpEM31	YpM	YpEM31	YpM
0.5	0.12	0.13	0.11	0.09
2.5	0.24	0.23	0.16	0.11
4.0	0.31	0.34	0.20	0.14
5.5	0.67	0.62	0.26	0.16
7.0	0.79	0.82	0.36	0.19
8.5	0.95	0.91	0.44	0.23
10	1.03	1.01	0.52	0.26

Tab. 10: Optische Dichte (bei 600 nm, 1 cm Schichtdicke) der Zellkulturen in Abhängigkeit der Zeit unter den promotorinduzierenden und nichtinduzierenden Bedingungen.

Werden die Daten graphisch dargestellt ist zu erkennen, daß die Zellen unabhängig von dem in ihnen enthaltenem Plasmid in Gegenwart von Glukose gleichmäßig gut wuchsen (Abb. 25). Wird das Medium auf Galaktose umgestellt, so sank die Wachstumsrate beider Parallelansätze, wobei diejenige der Kultur, die das Expressionsplasmid trägt, stärker abnahm.

Es ist daher anzunehmen, daß die durch die Induktion exprimierten Proteine das Wachstum der Zellen gehemmt haben.

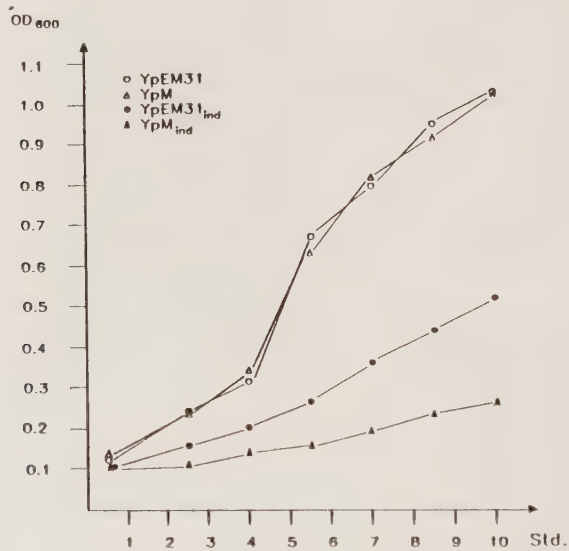


Abb. 25: Wachstumsrate der Kulturen unter nichtinduzierenden YpEM31 (○), YpM (△) und induzierenden Bedingungen YpEM31ind (●), YpMind (▲).

7.3. Aufarbeitung der Zellen und des Zellkulturüberstandes - Isolierung von Proteinen und RNA

Die Kulturen wurden abzentrifugiert und das Zellpellet nach Aufnahme in PBS/PMSF mit der French-Press weiterverarbeitet. Aus dem Kulturüberstand wurden durch Methanolzugabe die im Medium befindlichen Proteine präzipitiert, durch Zentrifugieren pelletiert und in PBS/PMSF aufgenommen. Als Nachweis der induktionsabhängigen Transkription wurde

nach der Hot-Phenol-Methode Gesamt-RNA isoliert, um eine Northern-Blot Analyse mit Proben gegen die mRNA der schweren und leichten Kette durchzuführen.

7.3.1. Northern-Blot Analyse von RNA induzierter und nichtinduzierter Hefezellen

Durch die Northern-Blot Analyse der Gesamt-RNA aus expressionsinduzierten und nichtinduzierten Hefezellen sollte ermittelt werden, ob die Transkription induktionsabhängig ist.

Die isolierte Gesamt-RNA wurde glyoxaliert, im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Als Proben wurden für die mRNA der schweren Kette das 540 bp große SacI-BamHI, für die mRNA der leichten Kette das 780 bp große KpnI-HindIII-Fragment aus pM radioaktiv markiert. Das Ergebnis, der mit diesen Proben durchgeführten Hybridisierung, ist in Abbildung 26 zu sehen.

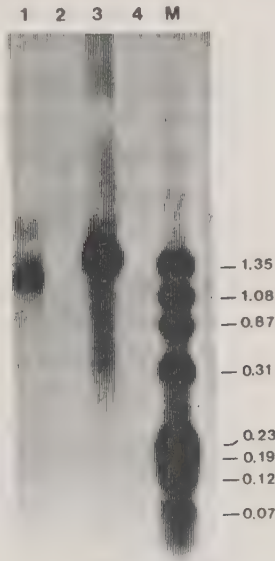


Abb. 26: Northern-Blot Analyse der Gesamt-RNA aus induzierten Hefezellen (1 und 3) und nicht induzierten Hefezellen (2 und 4) mit Proben gegen die mRNA der leichten (1 und 2) und schweren Kette (3 und 4). Die Signale entsprechen einer mRNA von 1.1 kb (1) bzw. 1.4 kb (3) Größe. Als Längenstandard wurde Φ X-174 x HaeIII verwendet (M).

Die Autoradiographie der Northern-Blot Analyse mit den Proben gegen die mRNA, die für die leichte bzw. die schwere Kette kodiert, zeigt Banden auf, die 1.1 kb und 1.4 kb groß sind. Dies bedeutet, daß die Induktion des Promotors zur Transkription der beiden Strukturgene geführt hat. Die Kontrollen zeigen, daß unter nichtinduzierenden Wachstumsbedingungen keine für die Proben spezifischen mRNAs transkribiert wurden und unspezifische Kreuzhybridisierungen ausgeschlossen werden konnten.

7.3.2. Analyse der Proteine durch SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Western-Blot

Bei der Proteinanalyse wurden folgende Fraktionen auf das eventuelle Vorhandensein der beiden die den Antikörper konstituierenden Polypeptide untersucht:

a) Die aus dem Zellkulturüberstand nach Methanolpräzipitation gewonnenen Proteine.

In diesem sollten sich allenfalls von den Zellen sezernierte Proteine befinden, da sich das Medium aus niedermolekularen Verbindungen zusammensetzt. Die Proben wurden jeweils mit dem Zusatz Ü (Zellkulturüberstand) versehen.

b) Der nach der Zentrifugation des French-Press Extrakts aufgearbeitete Überstand.

In diesem sollten sich wasserlösliche, aus zerstörten Zellen oder Zellkompartimenten freigesetzte Proteine befinden. Die Proben wurden jeweils mit dem Zusatz FPÜ (French Press Überstand) versehen).

c) Das nach der Zentrifugation des French-Press-Cell Extrakts gewonnene und in 0.5 ml PBS/PMSF suspendierte Pellet.

In dieser Fraktion sind größtenteils schwer wasserlösliche, in nicht aufgebrochenen Zellkompartimenten befindliche, oder mit Membranbruchstücken assoziierte Proteine. Die Proben wurden jeweils mit dem Zusatz FPP (French Press Pellet) versehen.

Aus den Zellkulturüberständen wurde die gesamte Präparation, von den anderen nur die im Text der Abbildung 27 beschriebene Proteinmenge auf ein 13%iges SDS-Polyacrylamidgel

aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und halbtrocken auf NC-Filter geblottet. Die Immunreaktion mit Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin-G und Ziege-anti-Kaninchen-Antikörpern (alkalische Phosphatase konjugiert) führte nach der Farbreaktion in der Kontrolle und der mit MFPP bezeichneten Fraktion aus induzierten mit pM transformierten F808 Zellen zu deutlich sichtbaren Signalen. In der Spur, auf welcher der wässrige Überstand des French-Press Aufschlusses (MFPÜ) elektrophoretisch aufgetrennt wurde, war zwar auch ein Signal zu sehen, dieses war aber bedeutend schwächer als das oben beschriebene (Abb. 27).

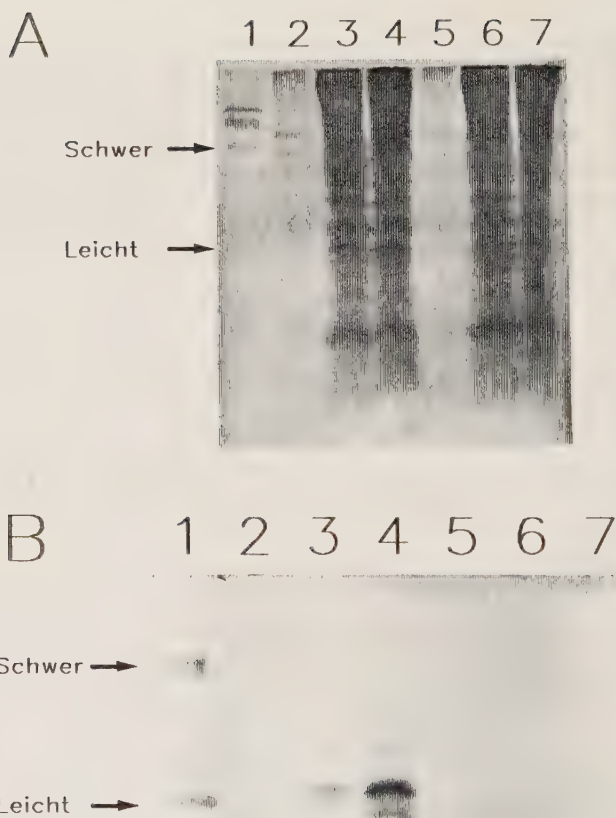


Abb. 27: Western-Blot Analyse der Proteine aus induzierten F808-Zellen, die mit pM (YpM) und pEMBLy31 (YpEM31) transformiert waren. **A:** Das Proteinmuster nach Ponceau S-Färbung. **B:** Das Muster der auf NC-Filter geblotteten Proteine nach der Immunreaktion.

6A4-mAK, Positivkontrolle (Aufgetragen wurden 1 µg)(1); MÜ (1 µg)(2); MFPÜ (10 µg)(3); MFPP (14 µg)(4); Negativkontrollen: EM31Ü (0.5 µg)(5); EM31FPÜ (14 µg)(6); EM31FPP (15 µg)(7).

Die schwere Kette konnte nicht nachgewiesen werden. Die leichte Kette trat in zwei Formen unterschiedlichen Laufverhaltens auf: Der überwiegende Anteil war um 0.5 kD größer, der

andere um 0.5 kd kleiner als die vom Antikörper, aus dem Aszites stammende leichte Kette (Abb. 27).

7.4. Austausch der Signalsequenz kodierenden cDNA der schweren Kette

Wie in allen Zellen höherer Organismen gilt auch in Hefezellen für Proteine, die sekretiert werden sollen, daß diese während oder nach ihrer Synthese von allen anderen Proteinen getrennt werden müssen (Emr et al., 1985). Dies geschieht durch die Wechselwirkung des hydrophoben Aminoterminus (Signalpeptid) der entstehenden Polypeptide mit dem SRP (signal recognition particle) und dem sich anschließenden kotranslationalen Transfer: Das gebildete Aggregat (SRP-Signalpeptid) wird vom auf dem endoplasmatischen Retikulum (ER) befindlichen "docking protein" erkannt und angelagert, wobei die wachsende Polypeptidkette in das ER hineinsynthetisiert wird (Walter und Blobel, 1981; Meyer et al., 1982). Sobald sich das Signalpeptid im ER befindet wird es von einer dort befindlichen Peptidase vom Rest der wachsenden Polypeptidkette getrennt (prozessiert).

Das Signalpeptid ist meistens zwischen 15 und 25 Aminosäuren lang und hydrophob.

Da bei der Western-Blot Analyse die schwere Kette nicht nachgewiesen werden konnte wurden folgende Annahmen getroffen:

a) daß sie synthetisiert, aber aufgrund des hefeunspezifischen Signalpeptids nicht in das ER der Zellen aufgenommen und von Proteasen im Cytoplasma degradiert wurde, oder

b) daß sie synthetisiert und nicht degradiert wurde, aber mit Zelltrümmern als wasserunlösliches Aggregat der Analyse nicht zugänglich war, oder

c) weil das Signalpeptid durch die Proteasen wegen mangelnder Spezifität nicht abgespalten wurde und sie deswegen mit anderen schwerlöslichen Bestandteilen assoziiert war.

Um dies zu überprüfen wurde eine hefespezifische signalpeptidkodierende DNA-Sequenz ausgewählt, die gegen die vorhandene ausgetauscht werden sollte. Es handelt sich um die bereits in einer heterologen Expression in *S. cerevisiae* verwendeten Killertoxin Leader-Sequenz aus der Hefe *Kluyveromyces lactis* (Baldari et al., 1987). Das Killertoxin wird von den Zellen in das sie umgebende Medium sezerniert, wobei die Signalsequenz während des

Exports durch Proteasen abgespalten wird (Radler und Pfeiffer, 1986; Bostian et al., 1984). Dies konnte auch für das von Baldari et al. in der Hefe *S. cerevisiae* heterolog exprimierte "Interleukin-Killerleader-Protein" beobachtet werden.

7.4.1. Mutagenese der Signalpeptid kodierenden cDNA der schweren Kette

Für die Mutagenese wurde anhand der bekannten DNA-Signalsequenz ein 72 Nukleotide langes Oligodeoxynukleotid (MM11) entworfen, das neben der, die Signalpeptid kodierenden Region des Killertoxins (fettgedruckt) am 3'- und 5'- Ende Sequenzen mit den bezüglich des Templates benötigten Homologien für die Mutagenese aufweist:

MM11:

5' - AAAATTCAATATAA
 ATGAATATATTTTACATATTTTGTGTTTTGCTGTCATTTCGTTCAAGGT
 Killertoxin kodierende Sequenz
 CAGGTCCAGC - 3'

In Abbildung 28 ist die Konfiguration der Sequenzen, wie sie während der Mutagenese vorhanden sein sollte, dargestellt.

M13mp19SGL MM11	3' - TTTTAAGTTATATTTAC 5' - <u>AAAATTCAATATAAATG</u> $T_m \approx 38^\circ\text{C}$							
Maus: CTTTCCGTGACCTAGAAAGAGAAGGACAAAAGTCAATGACGTCCACAGGTGAGG GluArgHisTrpIlePheLeuPheLeuPheSerValThrAlaGlyValHisSer ↑ A U S T A U S C H ↓								
Hefe: AATATATTTTACATATTTTGTGTTTTGCTGTCATTTCGTTCAAGGT AsnIlePhePheTyrIlePheLeuPheLeuLeuSerPheValGluGly								
<table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td style="width: 40%;">GTTCCAGGTCG - 5'</td> <td style="width: 60%;">M13mp19SGL</td> </tr> <tr> <td>CAGGTCCAGC - 3'</td> <td>MM11</td> </tr> <tr> <td colspan="2">$T_m \approx 34^\circ\text{C}$</td> </tr> </table>			GTTCCAGGTCG - 5'	M13mp19SGL	CAGGTCCAGC - 3'	MM11	$T_m \approx 34^\circ\text{C}$	
GTTCCAGGTCG - 5'	M13mp19SGL							
CAGGTCCAGC - 3'	MM11							
$T_m \approx 34^\circ\text{C}$								

Abb. 28: Darstellung der bei der Mutagenese ausgetauschten, die Signalpeptide kodierenden DNA-Sequenzen: M13mp19SGL ist die Einzelstrang DNA (minus Strang), die mutagenisiert werden sollte. Sie enthielt die ursprüngliche, mausspezifische Signalpeptid kodierende Sequenz der schweren Kette des 6A4-Antikörpers (57 Nukleotide, fettgedruckt). MM11 enthält die DNA-Sequenz der Killertoxin-Signalpeptids aus der Hefe *Kluyvermyces lactis* (48 Nukleotide, fettgedruckt). Unterstrichen sind die hybridisierenden Bereiche mit den Angaben der berechneten Schmelztemperaturen (T_m).

Bei der Reaktion handelt es sich um den gleichzeitigen Austausch und der Deletion von Sequenzen. Als Template für die Mutagenese diente die Einzelstrang DNA von M13mp19SGL, die bereits mit MM4 mutagenisiert worden war (siehe C 6.3. Abb. 23, Schritt 6). Die Reaktion wurde wieder bei 15 °C, RT und 37 °C durchgeführt, wobei sich wie bei den ersten Mutagenesen die höchste Temperatur als die geeignetste erwies. Von den in der Hybridisierung gefundenen Klonen wurden DNA-Minipräparationen angefertigt und zur Analyse mit den Restriktionsenzymen EcoRI und BamHI gespalten, um zu sehen, ob die EcoRI- bzw. BamHI-Schnittstelle (nach Mutagenese mit MM11 bzw. MM4) auch tatsächlich eliminiert wurden. Details zum Verlust der Schnittstellen sind in Abbildung 21 (C 6.3.) zu sehen. Die dort abgebildete Durchführung der Mutagenese ist identisch mit der hier beschriebenen, außer daß anstelle von MM5 das Oligodeoxynukleotid MM11 verwendet wurde. Das fertige Plasmid wurde mit **M13mp19SKGLm** bezeichnet.

7.4.2. DNA-Sequenzanalyse der mutagenisierten Region

Die Sequenzanalyse der fraglichen Region in M13mp19SKGL wurde mit einem eigens dafür synthetisiertem Oligodeoxynukleotid (MM9) durchgeführt. Es hybridisiert an die Positionen 151 mit 168 der die schwere Kette kodierenden cDNA-Sequenz.

In Abbildung 29 ist die Sequenz des mutagenisierten DNA-Bereichs und die Sequenz, die das ursprüngliche Signalpeptid kodiert und deren flankierende Basen zu sehen.

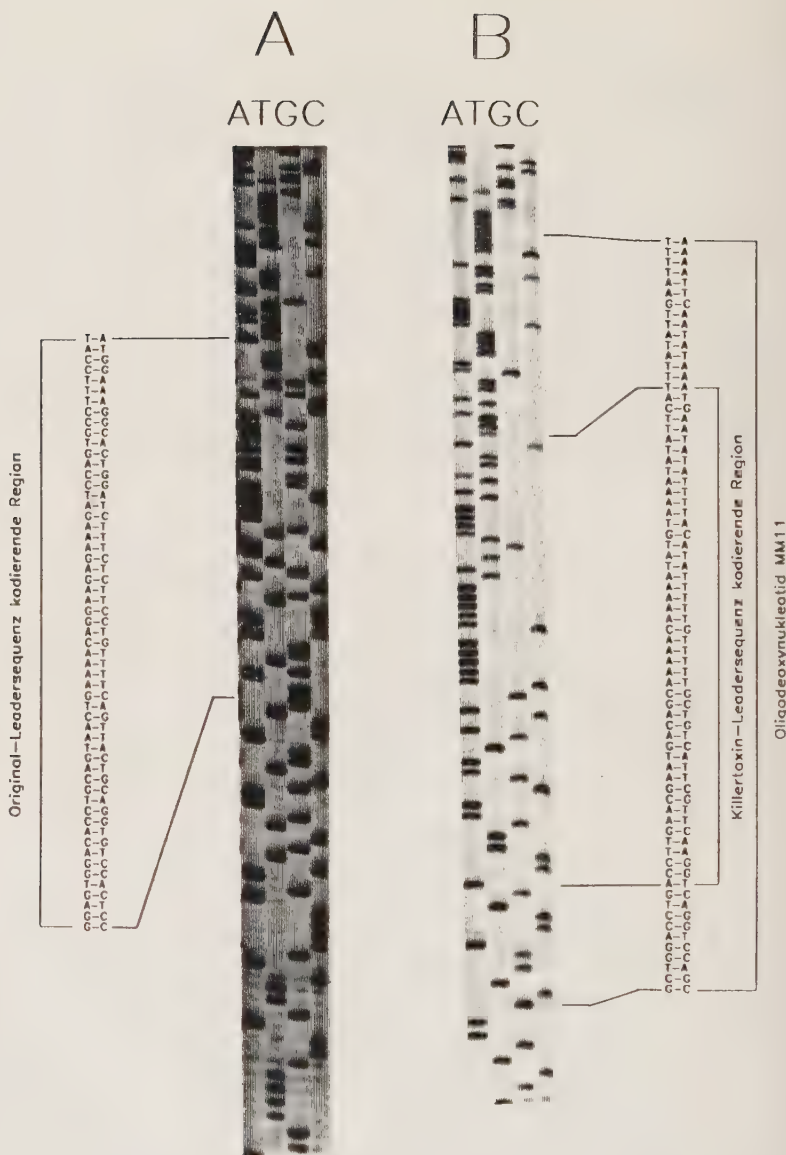


Abb. 29: DNA-Sequenzen, welche die beiden Signalpeptide kodieren.

A: Sequenz mit der Signalpeptid kodierenden Region der Maus.

B: Die gleiche Sequenz mit der Killertoxin-Signalpeptid kodierenden Region aus *Kluyveromyces lactis* nach der Mutagenese mit MM11. Der zum Oligodeoxynukleotid MM11 homologe Bereich ist gekennzeichnet.

7.4.3. Zusammenbau der Fragmente und Transformation

Das Expressionsplasmid wurde wieder in der gleichen Weise wie pM zusammengebaut (C 6., Abb. 23).

Aus M13mp19SKGLm wurde, nach der Spaltung mit den Restriktionsenzymen KpnI und BamHI, das Fragment mit der mutagenisierten Region in den mit den gleichen Enzymen gespaltenen pUC18TS eingefügt (C 6., Abb. 23, Schritt 9). Das entstandene Plasmid pUC18TSKGL wurde sodann mit den Restriktionsenzymen HindIII und KpnI gespalten. Das erhaltene Fragment wurde mit dem Sall-KpnI-Fragment aus pUC18TL mit dem zuvor durch die Restriktionsenzyme Sall-HindIII gespaltenen pEMBYe23 rekombiniert (C 6., Abb. 23, Schritt 11). Das dabei entstandene Expressionsplasmid wurde mit pMK bezeichnet.

Der Vektor pEMBYe23 hat bei etwas geringerer Größe als pEMBYe31 (7377 bp statt 8098 bp) einen anderen Selektionsmarker für Hefe, nämlich das *URA3* Gen. Er wurde ursprünglich gewählt, um das Konstrukt in einen *Schizosaccharomyces pombe* Stamm, der *Ura⁻* ist, zu transformieren.

Der *S. cerevisiae* Stamm F808 (*leu⁻*, *ura⁻*) wurde transformiert, wobei wiederum als Kontrolle der Vektor ohne Insertion verwendet wurde.

Mit pEMBYe23 konnten 78, mit pMK 56 Zellen transformiert werden. Die Transformanden wurden mit YpEM23 (pEMBYe23 in F808) und YpMK (pMK in F808) bezeichnet.

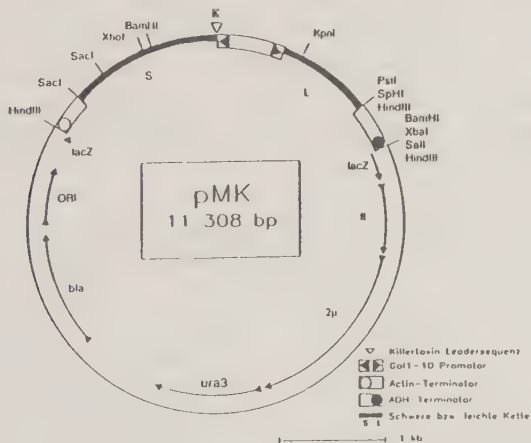


Abb. 30: Graphische Darstellung des Expressionsplasmids pMK (Restriktionsschnittstellen sind nur teilweise eingetragen).

7.5. Isolierung und Analyse der Proteine

Da nach lichtmikroskopischen Betrachtungen nur ein 20-30%iger Aufschluß der Hefezellen durch die French-Press beobachtet wurde, wurde im folgenden eine andere Zellaufschlußmethode gewählt. Statt der French-Press wurde diesmal ein Bead-Beater verwendet. Das Prinzip der Aufschlußmethode beruht darauf, daß in einem Gemisch aus kleinen ($\varnothing$ 0.5 mm) Glasperlen, den Zellen und Pufferlösung bei hoher Drehzahl und Kühlung die Zellen mechanisch zertrümmert werden.

Hiermit konnte ein 70-80%iger Aufschluß der Zellen erreicht werden.

Die Zellen (YpEM31, YpM und YpMK) wurden parallel in Selektionsmedien gezüchtet und die Expression der beiden Strukturgene induziert.

Aus 50 ml Zellkulturen wurden wiederum drei verschiedene Fraktionen jeder Kultur isoliert:

a) Die aus dem Zellkulturüberstand nach Methanolpräzipitation gewonnenen Proteine.

Die Proben wurden jeweils mit dem Zusatz $\bar{U}$ (Zellkulturüberstand) versehen.

b) Die nach der Zentrifugation des Bead-Beater Aufschlusses mit Methanol aus dem Überstand präzipitierten und in 4 ml PBS/PMSF suspendierten Niederschläge.

Die Proben wurden jeweils mit dem Zusatz $\overline{BBU}$ (Bead-Beater Überstand) versehen.

c) Das nach der Zentrifugation des Bead-Beater Aufschlusses gewonnene und in 3 ml PBS/PMSF suspendierte Pellet.

Die Proben wurden jeweils mit dem Zusatz $\underline{BBP}$ (Bead-Beater-Pellet) versehen.

Die isolierten Proteine wurden durch Elektrophorese in einem 13%igen SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und halbtrocken auf NC-Filter gebロットet. Nach der Immunreaktion konnte das Vorhandensein der schweren Kette sowohl in der mit MKBBP als

auch in der mit MBBP bezeichneten Probe nachgewiesen werden (Abbildung 31). Damit wurden folgende Punkte klar:

- 1) Die schwere Kette des Antikörpers wird nicht nur mit hefespezifischer Signalsequenz (MKBBP), sondern - was im ersten Expressionsversuch nicht beobachtet werden konnte - auch mit der ursprünglichen, mausspezifischen Signalsequenz in *S. cerevisiae* exprimiert (MBBP),
- 2) mit homologer Signalpeptid kodierender Sequenz wird die schwere Kette besser als die leichte Kette exprimiert, und
- 3) der Aufschluß mit dem als Bead-Beater bezeichneten Gerät war wesentlich wirkungsvoller als mit der French-Press.

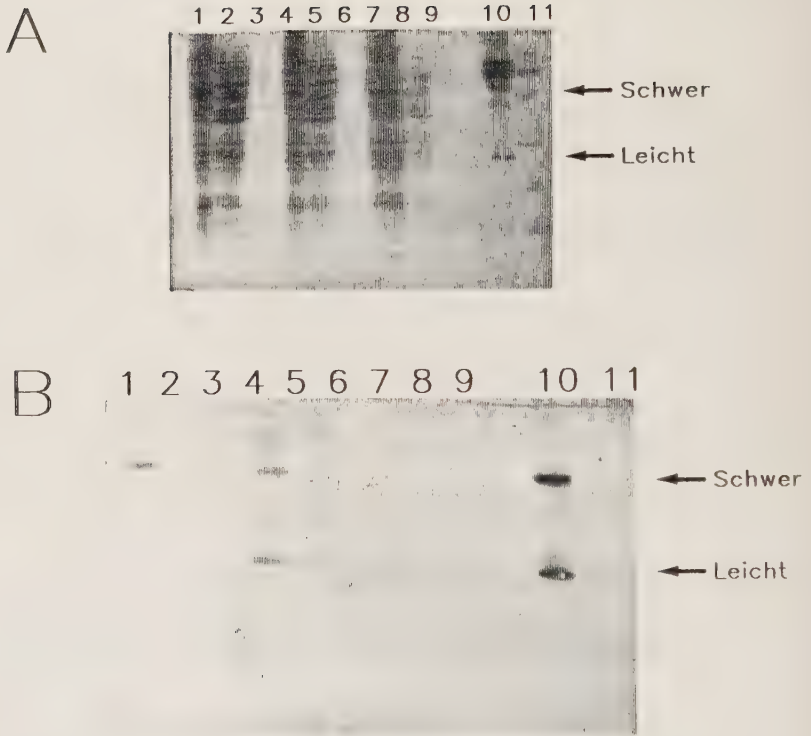


Abb. 31: Western-Blot Analyse der Proteine aus YpMK, YpM und YpEM23. **A:** Das Proteinmuster nach Coomassie-Färbung. **B:** Das Muster nach der Immunreaktion. MKBBP (12.0 µg)(1); MKBBÜ (6.8 µg)(2); MKÜ (0.4 µg)(3); MBBP (13.0 µg)(4); MBBÜ (5.7 µg)(5); MÜ (0.5 µg)(6); EM23BBP (10.0 µg)(7); EM23BBÜ (16.5 µg)(8); EM23Ü (1.5 µg)(9); 6A4-mAK (1.0 µg)(10); BioRad-Proteinmarker(11).

7.6. Löslichkeitsverhalten der Proteine

Das gesamte nachweisbare Material befindet sich in einem schwerlöslichen Präzipitat. Es stellte sich die Frage, ob nicht vielleicht noch mehr ungelöstes Material der schweren und der leichten Kette in den schwer wasserlöslichen Fraktionen (BBP) vorhanden war. Es sollte

deshalb versucht werden, diese mit verschiedenen Extraktionsmethoden in Lösung zu bringen.

Die Proben MKBBP, MKBBÜ, MBBP und TSBÜ wurden deshalb mit Harnstoff (Endkonzentration 8 M; durch langsames Zutropfen unter leichter Bewegung einer 10 M Harnstofflösung) bzw. Triton X100 (Endkonzentration 1%) versetzt, gut gemischt und 15 Min bei 4 °C mit 14 000 UpM (Sigmazentrifuge) abzentrifugiert. Die Proteine des wässrigen Überstandes wurden durch SDS/PAGE aufgetrennt, um eine Western-Blot Analyse durchzuführen.

In den Überständen befanden sich nach wie vor keine nachweisbaren Mengen der leichten und der schweren Kette. Die im schwerlöslichen Pellet befindlichen Peptide konnten auch nicht in Anwesenheit von Triton X100 oder Harnstoff in Lösung gebracht werden.

Im Fall der mit MKBBP bezeichneten Proben wurde nach Western-Blot Analyse im schwerlöslichen Pellet eine Doppelbande mit der Größe der 6A4-schweren Kette sichtbar. Für einen besseren Größenvergleich wurden die Proben von MKBBP und MBBP sowohl separat als auch mit 6A4-mAk aus Ascites gemischt, im SDS/PAG elektrophoretisch aufgetrennt und im Western-Blot analysiert (Abbildung 32).



Abb. 32: Western-Blot Analyse der im SDS/PAGE aufgetrennten und auch mit 6A4-mAk gemischten Harnstoff-Proben MKBBP und MBBP. **A:** Das coomassiegefärbte Gel. **B:** Immunreaktion der auf NC-Filter transferierten Proben. Biorad Proteinmarker (M), 6A4-mAk (2 µg)(1), 6A4-mAk (0.1 µg)(2), MBBP mit 6A4-mAk (7 µg und 0.1 µg)(3), MBBP wie zuvor alleine (4), MKBBP (6 µg)(5), MKBBP mit 6A4-mAk (6 µg und 0.1 µg)(6), 6A4-mAk (0.1 µg)(7).

Das Laufverhalten der Proteine aus den mit MKBBP bezeichneten Proben stimmt nur in einer Bande mit der Größe der leichten Kette des 6A4-mAk überein. Die obere Bande der Doppelbande könnte ein unprozessiertes, die untere ein falsch prozessiertes, d.h. in zu großer Entfernung vom N-Terminus gespaltenes Polypeptid sein.

Für eine klare Aussage müßte eine Aminosäuresequenzanalyse durchgeführt werden, für die jedoch das Material weder in ausreichender Menge noch Reinheit vorhanden war.

Die aus den mit MBBP stammenden Proteine wiesen das gleiche Laufverhalten wie diejenigen des 6A4-mAk auf und wurden wahrscheinlich richtig prozessiert. Endgültigen Aufschluß darüber kann ebenfalls nur eine N-terminale Aminosäuresequenzanalyse erbringen, die aus gleichen Gründen wie oben nicht durchgeführt wurde.

Es konnte gezeigt werden, daß die cDNA, die für γ -schwere und κ -leichte Kette eines Immunglobulins der Maus kodiert, heterolog in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert werden kann. Desweiteren wurde ein relativ starker Anstieg einer solchen Expression für die schwere Kette beobachtet, wenn diese mit der signalpeptidkodierenden Sequenz des Killertoxins aus der Hefe *Kluyveromyces lactis* versehen wurde.

Bindungsverhalten, Prozessierung und Glykosilierungsmuster könnten in weiteren Experimenten analysiert werden. Nach Optimierung der Expression könnte ein Antikörper erhalten werden, der nach Reinigung auf seine Protektivität im Maussystem untersucht werden sollte.

Ziel der vorliegenden Arbeit war die Klonierung der cDNA, die den medizinisch relevanten monoklonalen Antikörper 6A4 kodiert. Dies wurde mit der Absicht gemacht, die DNA und die daraus ableitbare Aminosäurezusammensetzung zu analysieren. Die erhaltenen Daten waren für die Konstruktion des Expressionsplasmids notwendig, und bilden die Grundlage für eine spätere "Humanisierung" der Sequenz, d.h., den Austausch der konservierten mausspezifischen DNA-Regionen gegen die von humanen Immunglobulinsequenzen.

1. ERSTELLEN DER cDNA-BANK

Im Laufe der Experimente wurde festgestellt, daß die für die cDNA-Synthese benötigte, hochwertige poly(A)⁺RNA nur aus Zellen isoliert werden konnte, die eine Vitalität von über 85% aufwiesen. Die anfänglich eingesetzte poly(A)⁺RNA stammte aus Kulturen mit Zellen die eine Vitalität zwischen 65 und 75% hatten. Ansätze, aus diesem Material cDNA mit der nötigen Qualität zu synthetisieren, schlugen fehl. Die durchschnittliche Länge der Reaktionsprodukte war kleiner als 500 bp, also vollkommen ungeeignet für die vollständige Klonierung der cDNA der leichten und schweren Kette eines Immunglobulins. Es wurde eine strenge Korrelation zwischen der Vitalität der Zellen, der durchschnittlichen Größe der isolierten mRNA und der Länge der Syntheseprodukte ermittelt. Ausbeute von cDNA, sowie Anzahl und Länge der in den positiven Klonen enthaltenen Insertionen, die für die schwere oder die leichte Kette des 6A4-mAk kodieren untermauern diese Aussage.

Die Anzahl der cDNA-enhaltenden Klone war mit ca. 5 000 sehr gering, aber ausreichend groß, da davon ausgegangen wird, daß 0.1 - 0.5% der poly(A)⁺RNA Antikörper exprimierender Hybridomzellen für die beiden Ketten kodiert (Liu et al., 1984). Nachdem die cDNA-Bank etabliert war, wurden in der ersten Hybridisierung mit der DNA-Probe der schweren Kette 121 positiv reagierende Transformanten gefunden. Diese Zahl betrug mit der DNA-Probe der leichten Kette 327. Das sind bezogen auf die Gesamtzahl der cDNA enthaltenden Klone 2.5% bzw. 6.8%. Die in der ersten Hybridisierung erhaltene Verteilung der positiven Signale änderte sich bei einer wiederholten Hybridisierung, bei der Doppelfilter angelegt wurden. Die Anzahl der nun eindeutig positiven Signale sank in beiden Fällen: Um 57% für die schwere Kette (von 121 auf 69) und um 23% für die leichte Kette (von 327 auf 74). Die somit erhaltenen Anteile reduzierten sich, wiederum bezogen auf die Gesamtzahl der cDNA enthaltenden Klone, auf 1.4 bzw. 1.5% ("schwer" bzw. "leicht"). Die ungleiche

Abnahme dürfte in der Verschiedenheit der Proben liegen. Der stärkere Abfall wurde bei der Oligodeoxynukleotidprobe gegenüber der durch zufälliges Initiieren polymerisierten Probe (kurz "zip-Probe") erhalten. Die Reaktion des Oligodeoxynukleotids mit seiner komplementären Sequenz war demnach weniger spezifisch als die der "zip-Probe". Die gleichgroße Anzahl von Klonen, die schwere und leichte Kette kodierende Sequenzen enthielten, ließ bereits klonierte cDNAs mit vollständiger Länge erwarten. Die nach dem Ergebnis der ersten Hybridisierung getroffene Annahme, daß die zahlenmäßig ungleiche Verteilung positiver Klone auf die unterschiedliche Lage der beiden Proben bezüglich des 3'-Endes der mRNA zurückzuführen ist, konnte nach der zweiten Hybridisierung nicht mehr aufrecht erhalten werden. Die Suche nach den Transformanten, welche die, die schwere Kette kodierende cDNA enthalten, wurde mit einem Oligodeoxynukleotid (MM1) durchgeführt, dessen komplementäre Sequenz ca. 1000 bp vom poly(A)-Schwanz der mRNA entfernt liegt. Die für die Suche nach der leichten Kette kodierenden cDNAs verwendete Probe hatte ihre entsprechende komplementäre Sequenz sehr viel näher (500-150 bp) am 3'-Ende der mRNA. Somit hätten mit der Probe, welche die Spezifität für die cDNA der leichten Kette hat, mehr unvollständig synthetisierte cDNAs reagieren können, als mit der Oligodeoxynukleotidprobe. Wie die annähernd gleich hohen Anteile von Klonen mit Insertionen für schwere und leichte Kette zeigt, war dies allerdings nicht der Fall, was auch später dadurch bestätigt wurde, daß der überwiegende Teil der erhaltenen positiven Klone offenbar die vollständige kodierende Sequenz enthielt. Die erstellte cDNA-Bank kann, da sie konserviert wurde, auch als Quelle für die Isolierung anderer Gene genutzt werden.

2. **DIE DNA-SEQUENZEN DES 6A4-ANTIKÖRPERS UND IHRE BEDEUTUNG INNERHALB BEKANNTER IMMUNGLOBULIN-SEQUENZEN**

Die Polypeptidketten der Immunglobuline bestehen aus zwei Regionen, dem aminoterminalen, als variable Region bezeichneten und dem carboxyterminalen, als konstante Region bezeichneten Teil. In embryonalen Zellen sind die beiden Regionen in weit voneinander entfernten DNA-Segmenten lokalisiert. Während der Differenzierung, von aus dem Knochenmark stammenden B-Lymphozyten, werden diese Segmente durch Rekombinationsereignisse miteinander verbunden, wobei die endgültige Transkriptionseinheit entsteht (Adams, 1980; Tonegawa et al., 1980; Leder, 1982;). Im Folgenden werden die Segmente der leichten sowie der schweren Kette des 6A4-mAk auf Nukleotidebene und - sofern nur Aminosäuredaten zur Verfügung standen - der Ebene der daraus ableitbaren Aminosäuresequenz diskutiert.

2.1.

Sequenzdaten die für die κ leichte Kette kodieren

Bereits bekannte, an der Maus durchgeführte Untersuchungen zeigten, daß für die variable Region der leichten Kette zwei separate DNA-Segmente kodieren: der V-Teil, der den größten Teil der variablen Region enthält und der J-Teil, der den Rest dieser Region kodiert. Bei der somatischen Rekombination in B-Lymphozyten wird das 3'-Ende des V-Segments mit dem 5'-Ende des J-Segments verknüpft. Die beiden Bereiche, die das Signalpeptid und den konstanten Teil kodieren, sind durch Introns von der variablen Region getrennt. Die zwei intervenierenden Sequenzen werden erst nach der Transkription durch Prozessieren der prä-mRNA entfernt (Brack et al., 1978; Gottlieb, 1980).

Eine von Herrn Eckerskorn an diesem Institut durchgeführte Aminosäureanalyse des N-Terminus der leichten Kette von dem aus Aszites stammenden 6A4-mAk ergab für die ersten vier Aminosäuren die Sequenz Asp-Ile-Val-Met. Dieses Ergebnis weist darauf hin, daß die ersten 20 Aminosäuren der kodierenden Region das Signalpeptid spezifizieren und daß die prozessierte leichte Kette 219 Aminosäuren lang sein muß. Dieses Resultat steht in Übereinstimmung mit der Aminosäuresequenz anderer leichter Ketten, deren erste vier Aminosäuren mit den hier erhaltenen identisch sind (Abb. 33).

Der die Signalpeptidsequenz kodierende Bereich beinhaltet die Nukleotide 1 bis 60 (siehe Abb. 14). Die Organisation auf Aminosäureebene zeigt die allen Signalpeptiden eigene Struktur, welche einen hydrophilen N-Terminus (hier Met-Asp-Ser-Gln) gefolgt von einem hydrophoben Bereich besitzen (Perlman und Halvorson, 1983). Innerhalb dieser Sequenz befindet sich eine für Signalsequenzen κ leichter Ketten charakteristische Region, mit Leucin an den Positionen 8, 10, 11, 12, 13. Die Aminosäure Cystein an der vorletzten Position ist zwar sehr häufig, aber nicht in allen bekannten Fällen invariant (Kabat et. al., 1987).

In der variablen Region der leichten Kette wurde durch Vergleiche auf Aminosäureebene ein Segment gefunden, das sich mit Ausnahme von sechs Aminosäuren zur Vk8-Gruppe zuordnen läßt. Die Abweichungen befinden sich an den Positionen 25, 32, 53, 54, 55, 58 und zeigen folgende Konversionen: Thr→Ser, Ser→Ala, Gly→Ile, Asn→Thr, Glyn→Arg und Tyr→Phe. Die Unterschiede liegen innerhalb der in dieser Gruppe von Potter et al. (1982) festgesetzten Grenzen, die nämlich eine Gruppenzugehörigkeit bei Substitution von bis zu 12 Aminosäuren erlaubt. In Abbildung 33 sind die für die Vk8-Gruppe spezifischen Aminosäuren der leichten Kette des 6A4-mAk im Vergleich mit sieben bekannten Vertretern der Gruppe dargestellt.

HPC126 ⁴	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	A	W	
MOPC384 ⁴	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	Y	L	A	W	
TFPC132 ⁴	D	I	V	M	T	Q	S	V	S	S	L	S	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	<u>S</u>	K	N	Y	L	A	W	
PRY16 ⁴	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	<u>I</u>	V	T	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	<u>E</u>	S	L	L	N	S	<u>R</u>	R	N	Q	K	N	Y	L	<u>T</u>	W
HY45-165 ⁴	D	I	V	M	<u>S</u>	Q	S	P	S	S	L	S	V	A	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	K	N	Y	L	<u>T</u>	W	
MCPC603 ⁶	D	I	V	M	T	Q	S	P	S	S	L	S	V	S	A	G	E	<u>R</u>	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	G	N	Q	K	N	<u>E</u>	L	A	W	
45-165CRI ⁴	D	I	V	M	<u>S</u>	Q	S	P	S	S	L	<u>A</u>	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	<u>R</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	K	N	Y	L	<u>T</u>	W	

6A4-1leicht	D	I	V	M	<u>S</u>	Q	S	P	S	S	L	<u>A</u>	V	S	A	G	E	K	V	T	M	S	C	K	S	S	Q	S	L	L	N	S	<u>I</u>	<u>T</u>	<u>R</u>	K	N	<u>E</u>	L	A	W
	21											30												40																	61

Abb. 33: Vergleich verschiedener Vk8 Elemente mit der leichten Kette des 6A4-mAk. Konservierte Aminosäuren sind fettgedruckt. Abweichende Aminosäuren sind unterstrichen. (*Potter et al., 1982; ⁴Rudikoff et al., 1981; ⁴Margolies et al., 1981).

Keine der abweichenden Aminosäuren gehört den invarianten Aminosäureresten, wie sie von Kabat et al. (1987) beschrieben wurden, an. Sie tragen somit auch zu den charakteristischen Bestandteilen des 6A4-mAk bei. Die beiden ähnlichsten Sequenzen, die für den gesamten variablen Bereich der 6A4- κ -leichten Kette gefunden werden konnten, kodieren den entsprechenden Teil monoklonaler Antikörper (45-165CRI mit Spezifität gegen Azophenylarsonat und MCPC603 mit Spezifität gegen Phosphorylcholin), wie sie von Margolies et al. (1981) und Rudikoff et al. (1981) analysiert und beschrieben wurden. Sie zeigen eine Übereinstimmung in 45 von 47 bzw. 88 von 110 Aminosäurepositionen. Das zwischen der variablen und der konstanten Region liegende typische J κ -Segment konnte auf Nukleotidebene der J κ 1-Gruppe zugeordnet werden. Dessen erste beide Nukleotide am 5'-Ende sind CG. In genomischer DNA ist das erste Nukleotid des J κ 1-Segments ein T (Sakano et al., 1979; Leder et al., 1980). Im Rahmen der Umgruppierung der Segmente bei der Antikörperdiversifizierung ist jedoch das Auftreten von GT, CG und CC möglich (Gottlieb, 1980).

Der konstante Teil der 6A4 leichten Kette entspricht mit 100% Homologie von Nukleotid 398 bis einschließlich Nukleotid 717 der von Hamlyn et al. (1981) publizierten κ -konstanten Region.

Neben den beschriebenen kodierenden Sequenzen sind 5' und 3' nicht translatierte Bereiche vorhanden. In der analysierten cDNA sind nur die letzten 18 Nukleotide der im allgemeinen 150 Nukleotide langen 5'-Leadersequenz enthalten (Klein, 1982). Der 3' nicht translatierte Bereich ist 217 Nukleotide lang. Vom poly(A)-Schwanz wurden sieben Nukleotide kloniert. Das Polyadenylierungssignal (AATAAA) beginnt an Position 906 und ist 17 Nukleotide von der Polyadenylierungsstelle entfernt.

Die erörterten Charakteristika und Vergleiche mit existierenden Sequenzen zeigen, daß die leichte Kette des 6a4-mAk die spezifischen Segmente einer κ leichten Kette der Maus aufweisen. Aufgrund der Abweichungen, die die Bindungsspezifität des 6A4-mAk bewirken, repräsentiert sie einen bisher noch nicht beschriebenen Typ einer Immunglobulin κ leichten Kette.

2.2. Sequenzdaten die für die γ schwere Kette kodieren

Die variable Region der schweren Kette setzt sich aus drei Segmenten (V, D und J) zusammen. Wie bei der DNA der leichten Kette werden während der somatischen Rekombination in B-Lymphozyten alle drei den variablen Teil kodierenden DNA-Segmente miteinander verbunden. Der so entstandene variable Teil, sowie die für Signalpeptid, CH₁-, Brücken-, CH₂- und CH₃-Region kodierenden und durch Introns voneinander getrennten Teile werden erst beim Prozessieren der prä-mRNA miteinander verbunden (Adams, 1980; Tonegawa et al., 1981; Leder, 1982).

Die variable Region der schweren Kette konnte der Subklasse II (B) zugeordnet werden (Kabat et al., 1987). Dies wurde aus einer Homologie von 95,8% bei einem Vergleich von 48 stark konservierten, invarianten, innerhalb der ersten 98 auftretenden Aminosäureresten abgeleitet. Das sind 5,8% mehr Übereinstimmung als mit Subklasse I und weit mehr als mit jeder anderen Subklasse. Die abweichenden Aminosäuren liegen an Position 31 (Ala anstatt Val) und 63 (Asn anstatt Lys). Auf Nukleotidebene manifestieren sich diese Unterschiede in den Sequenzen GCA anstatt GTG und AAC anstatt AAG (Kabat et al., 1987).

Das D-Segment erstreckt sich von Nukleotid 355 bis einschließlich 367 und konnte der SP2 Familie zugeordnet werden. Es weist jedoch Abweichungen in Nukleotid 361 (A statt G) und 363 (C statt T) im Vergleich zu D(SP2.2) auf (Kurosawa und Tonegawa, 1982; Kurosawa et al., 1981).

D (SP2.2)	TC	TACTATGATTACG	AC
6A4	G.	A.C.....	.G
		← D-Segment →	

Das D-Segment ist mit einem Jh4-Segment verbunden, wie es von Maizels und Bothwell (1985) beschrieben wurde. Der Übergang zwischen D und Jh4 wird durch die Sequenz AGGGG gebildet, eine Sequenz die in rearrangierten VDJ-Segmenten aus Hybridomzelllinien noch nicht isoliert wurde, aber in der 3'-flankierenden DNA des D-Segments aus

Keimbahozellen enthalten ist und daraus abgeleitet werden kann (Kurosawa und Tonegawa, 1982; Kurosawa et al., 1981; Klein, 1982; Early et al., 1980).

Die Region von Nukleotid 418 bis zu Nukleotid 1407, die den konstanten Teil der schweren Kette kodiert, weist zur entsprechenden, von Schreier et al. (1981) veröffentlichten Sequenz für das 2a^a Allel der γ -Kette, vollkommene Homologie auf.

Für den N-Terminus der schweren Kette konnte keine Aminosäuresequenz ermittelt werden, da dieser für die automatische Aminosäuresequenzanalyse unzugänglich war. Dieses Resultat deutet darauf hin, daß die prozessierte Kette mit einem Glutamin beginnt. Durch Vergleiche mit den ersten elf Aminosäuren anderer prozessierter schwerer Ketten der Subklasse II(B), wurde vollständige Übereinstimmung in Position 20 bis 30 (Gln-Val-Gln-Leu-Gln-Gln-Ser-Gly-Ala-Glu-Leu) der 6A4-schweren Kette gefunden (Kabat et al., 1987). Daher kann angenommen werden, daß das Glutamin an Position 20 tatsächlich die erste Aminosäure der prozessierten schweren Kette ist. Dies bedeutet, daß das reife Polypeptid der schweren Kette 450 Aminosäuren lang ist und aus einem aus 469 Aminosäuren bestehenden Vorläufermolekül entsteht.

Der das Signalpeptid kodierende Bereich ist demzufolge 57 Nukleotide lang und weist die für ihn charakteristische Zusammensetzung von Aminosäuren auf: Einem kurzen hydrophilen N-Terminus (Met-Glu-Arg-His-Trp) schließt sich ein hydrophober Bereich an (Perlman und Halvorson, 1983).

5' und 3' nicht-translatierte Bereiche der hier analysierten cDNA sind 48 bzw. 113 Nukleotide lang. Damit enthält der 5'-Bereich der cDNA sicher nicht das 5'-Ende der mRNA, dessen 5'-Leader-Sequenz 150 Nukleotide lang sein sollte (Klein, 1982). Das Polyadenylierungssignal (AATAAA) beginnt bei Position 1479. Vom 26 Nukleotide entfernten poly(A)-Schwanz sind in der cDNA 10 Nukleotide enthalten.

Die kodierende Sequenz der schweren Kette weist alle zu erwartenden typischen strukturellen Merkmale und Segmente einer Immunglobulin γ schweren Kette auf. Die durch die bei der Entstehung der kodierenden Sequenz stattfindenden Rekombinationsereignisse verleihen ihr diejenigen strukturellen Eigenschaften die zur Antigenspezifität des fertigen 6A4 Antikörpers beitragen. Auch diese Sequenz stellt damit eine noch nicht beschriebene cDNA dar.

3. Expression der schweren und der leichten Kette

In Northern-Blot Analysen mit RNA aus expressionsinduzierten YpM-Zellen wurden vollständige Transkripte der beiden, die schwere und die leichte Kette kodierenden cDNAs nachgewiesen. Dies steht im Einklang mit bekannten Daten aus Ergebnissen heterologer Genexpressionen unter Kontrolle homologer Promotor- und Terminatorsignale (Kingsman et al., 1985). Die Reprimierbarkeit des *GAL1-10* Promotors durch Galaktose im Kulturmedium konnte auch hier gezeigt werden. In der Analyse mit Proteinen derselben induzierten Kultur, wie sie für den Northern-Blot durchgeführt wurde, konnten in der Fraktion des sedimentierten French-Press Aufschlusses lediglich zwei Proteine mit der ungefähren Größe der leichten Kette nachgewiesen werden. Bei einem oder auch beiden Proteinen könnte es sich um nicht oder falsch prozessierte, leichte Ketten handeln. Hierfür gibt es Beobachtungen, wie z.B. die des in *S. cerevisiae* exprimierten prä- α_1 -Antitrypsins. Für dieses konnte ebenfalls eine unprozessierte, nicht sekretierte Form nachgewiesen werden (Cabezón et al., 1984). Im gleichen Expressionsexperiment konnte die schwere Kette in keiner der untersuchten Fraktionen nachgewiesen werden, obwohl die Signalsequenz eine klassische Aminosäurezusammensetzung enthält. Diese zeichnet sich durch einen kurzen, aus geladenen Aminosäuren bestehenden N-Terminus aus, dem ein hydrophober Kernbereich und die Konsensussequenz der Signalpeptidase folgt (Perlman und Halvorson, 1983). Denkbar wäre die Synthese der schweren Kette und ein rascher Abbau durch Proteinasen, für die das Maus-Signalpeptid ein Substrat darstellt. Das Vorkommen solcher Enzyme in Hefe ist bekannt (Cooper, 1982). Es ist auch vorstellbar, daß die schwere Kette zwar synthetisiert, aber nicht prozessiert wurde und mit anderen hydrophoben Zellbestandteilen derart in Wechselwirkung getreten ist, daß sie immunologisch nicht mehr nachweisbar war.

Ein weiterer Grund hätte in der limitierenden Konzentration bestimmter tRNAs gesucht werden können. Die hier klonierte cDNA enthält allerdings Kodons, deren Streuung - abgesehen von einer Ausnahme - innerhalb der Verteilung des Kodongebrauchs von hoch- und niedrig exprimierten Hefegenen liegt. Diese Ausnahme bezieht sich auf das Kodon CGA für Arginin. Es ist in Hefe relativ selten vertreten (Ikemura, 1982; Guthrie und Abelson, 1982; Bennetzen und Hall, 1981), kodiert aber 38% aller Argininreste der leichten Kette. In der cDNA, die für die schwere Kette kodiert, ist es nicht vorhanden. Das in den Experimenten erhaltene Resultat steht somit im Gegensatz zum Kodongebrauch für Arginin in der Hefe, wonach eher die schwere Kette hätte exprimiert werden sollen.

Dies stimmt mit Erfahrungen überein, wonach nicht der Mangel geladener tRNAs, sondern vielmehr die niedrige Konzentration an mRNAs die vorherrschende Ursache für niedrige Translationsraten ist (Kingsman et al., 1985). Für die Optimierung der Expression sollte

deshalb zuerst versucht werden, die mRNA-Konzentration durch Austesten verschiedener Promotoren zu steigern und danach erst die Kodons an das tRNA-Reservoir der Hefe anzupassen.

Mit der French-Press konnte nur ein geringer Bruchteil (20-30%) der Hefezellen aufgeschlossen werden. Als alternative Methode bot sich der Aufschluß mit dem Bead-Beater an. Mit diesem Gerät konnten 50% mehr Zellen aufgeschlossen werden, darüberhinaus konnte nun die schwere Kette nicht nur in Proteinfractionen aus YpMK- sondern auch aus YpM-Zellen nachgewiesen werden. Dies war mit aus der French-Press erhaltenen Proteinen nicht möglich. Offensichtlich ist bei der French-Press Methode die Druckentspannung nicht groß genug, alle Kompartimente wie Golgi-Komplex, endoplasmatisches Retikulum, Vakuole und sekretorische Vesikel aufzubrechen. Dies ist von Bedeutung, da diese Organelle das Ziel von Signalpeptiden - und somit auch der schweren Kette - sein können (Sabatini et al., 1982; Schekman und Novick, 1982). Die Nachweisbarkeit der schweren Kette aus YpM-Zellen spricht für die Annahme, daß zumindest ein Teil der Zellkompartimente und somit der darin enthaltenen Stoffe durch den Bead-Beater-Aufschluß der Analyse besser zugänglich wurden. Das voneinander abweichende Verhalten der schweren Kette in den Proteinfractionen aus beiden Methoden läßt vermuten, daß schwere und leichte Ketten in der Zelle unterschiedlich lokalisiert sind. So könnte die leichte Kette z.B. in der Vakuole, die schwere Kette in der Zellwandmembran vorzufinden sein. Die Menge der schweren Kette konnte durch Wechsel des Signalpeptids verändert werden. Mit dem Signalpeptid des Killertoxins konnte mehr schwere als leichte Kette nachgewiesen werden, wodurch in der Western-Blot Analyse ein gegenüber zu den originalen Sequenzen reziprokes Bild erhalten wurde. Hierfür könnte eine höhere Affinität des Peptids zu den Rezeptoren, die in der Translokation involviert sind, eine Rolle spielen. Dies stimmt mit Beobachtungen überein, die zeigen daß homologe Signale sowohl auf DNA- als auch auf Peptidebene die Expression heterologer Gene positiv beeinflussen (Kingsman et al., 1985).

Die nach den Expressionsversuchen bei den Analysen der γ -schweren Kette aufgetretenen Phänomene stehen im Gegensatz zu den von Wood et al. (1985) gemachten Erkenntnissen, ohne Modifikation der Signalsequenzen die schwere und leichte Kette eines Maus Immunglobulins in *S. cerevisiae* exprimieren zu können. Die dabei verwendete schwere und leichte Kette gehören jedoch der λ - bzw. μ -Klasse ("schwer" bzw. "leicht") an, außerdem wurde ein anderer *S. cerevisiae* Stamm verwendet. Die Folgerung daraus ist, daß momentan für die Expression verschiedener Immunglobulinklassen keine Vorhersage bezüglich Ihrer Expimierbarkeit in *S. cerevisiae* getroffen werden kann.

Die hier besprochenen Expressionsprodukte waren ausschließlich in Proteinfractionen enthalten, die nach dem Zentrifugieren der Aufschlüsse als schwerlösliches Pellet erhalten wurden. Im wässrigen Überstand konnte nur ein äußerst geringer Anteil der leichten Kette, die schwere Kette aber überhaupt nicht nachgewiesen werden. Das Phänomen bei der leichten Kette könnte damit begründet werden, daß sie zum Teil mit Lipiden assoziiert war und deshalb durch Zentrifugation nicht quantitativ sedimentiert werden konnte. Hierfür könnte neben den bereits erwähnten Gründen keine oder aber fehlerhafte Glykosylierung eine Rolle spielen, wie sie normalerweise im Golgi-Komplex stattfindet und deren Funktion bei der Sekretierbarkeit von Bedeutung sein kann.

Die in dieser Arbeit erhaltenen und diskutierten Ergebnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

- Die Vitalität der Hybridomzellen hat auf die Qualität der aus ihnen isolierten RNA und damit auch auf die Ausbeute und Länge der synthetisierten cDNA erheblichen Einfluß.
- Der gesamte kodierende Bereich der schweren und der leichten Kette des 6A4-mAk konnten kloniert werden. Die Analyse der Primärstruktur stellt in den hypervariablen Bereichen eine noch nicht klonierte Immunglobulin cDNA dar. Es ist zudem die erste klonierte cDNA eines gegen das Oberflächenmembranprotein I von *P aeruginosa* gerichteten monoklonalen Antikörpers.
- Die heterologen Peptide dieses Maus-Antikörpers konnten in der Hefe *S. cerevisiae* exprimiert werden. Nach dem Austausch der DNA, die das mausspezifische Signalpeptid der schweren Kette kodiert, gegen die entsprechende Sequenz des Killertoxins aus der Hefe *Kluyveromyces lactis*, konnte die nachweisbare Menge exprimierten Materials erhöht werden. Eine Sekretion konnte auch nach diesem Austausch nicht erhalten werden.

Das während dieser Arbeit produzierte Material und die hierbei erhaltenen Daten, bieten die Grundlage für etliche weitere Experimente. Sinnvoll könnten modifizierte Expressionsversuche mit den vorhandenen Plasmiden pM und pMK sein. Es könnte versucht werden, aus verschiedenen Wachstumsstadien von YpM und YpMK Kulturen - z.B. frühe und späte stationäre Phase - Proteine zu isolieren und zu analysieren. Als positiv regulierendes Element ist auch der Einbau der GAL4 kodierenden DNA in die Vektoren

denkbar. Da Hefen generell die Möglichkeit der ökonomischen Produktion heterologer Proteine bieten, sollten andere Stämme und auch die evolutionär höher stehende Hefe *Schizosaccharomyces pombe* für Expressionsversuche verwendet werden. Die Expressionsplasmide pM und pMK enthalten die dafür notwendigen Elemente. Bei genügend hoher Expressionsrate und nach Reinigung des Antikörpers, wäre dessen Bindungsverhalten gegenüber Protein I *in vitro* und seine biologische Aktivität *in vivo* zu überprüfen. Bei guter Antigenerkennung wäre der Antikörper ein brauchbares, diagnostisches Hilfsmittel, um *P. aeruginosa* in klinischen Isolaten nachweisen zu können. Sollte die biologische Aktivität nicht zufriedenstellend sein, müßten andere Expressionssysteme ausgewählt werden. Geeignet scheinen hierfür CHO (Chinese Hamster Ovary) Zellen oder das Baculovirus System. Dazu müßten schwere und leichte Kette kodierende DNA in andere Vektoren eingefügt werden, was bei der Vielzahl vorhandener Plasmide mit Teilen beider DNAs ohne größeren Aufwand durchführbar wäre. Wegen der Immunogenität speziessfremder Immunglobuline könnte in parallelen Ansätzen ein "Baukastensystem" etabliert werden, womit Antigen bindende Domänen von Mausantikörpern routinemäßig mit den für eine "Humanisierung" notwendigen Elementen verknüpfbar würden, um sie dann in einem der Systeme zu exprimieren.

I. GERÄTE

Aminco, SLM Instruments Inc., American Instrument Company, Urbana, Illinois
French pressure cell press;

Bachofer GmbH (Reutlingen):

Eppendorf Zentrifuge 5414 S;
Mixer 5432;
Thermostat 5320;
UV Handlampe (254/365 nm, 2 x 6 Watt);
Polaroid MP-4 Vielzweck Land Kamera;

Beckman Instruments GmbH (München):

LS 6800 Szintillationszähler;
TL 100 Ultrazentrifuge mit TLV100-Rotor;
L8-70 Ultrazentrifuge mit TSV80-Rotor;

BioRad Laboratories (München):

Polypropylene chromatography columns (731-1550);
Trans-Blot Cell Electrophoresis Apparatus, Model #1703910;

Biospec Products, Bartlesville, Ok.

Bead-Beater;

C.A. Greiner und Söhne GmbH & Co. KG (Nürtingen):

Petrischalen;

Corning Medical GmbH (Fernwald):

Colorimeter 252, mit 600 nm Filter;

Dupont de Nemours (Deutschland) GmbH (Dreieich):

Chronex intensifying screens Quanta III;

Heraeus Christ (Gräfelfing):

Minifuge GL Typ 4400;

Hettich Zentrifugen (Tuttlingen):

Mikroliter Zentrifuge Typ 2025;

LKB Instruments GmbH (Gräfelfing):

Spektralphotometer: LKB Biochrom Ultrospec II;

New England Nuclear (NEN) Research Products (Dreieich):

Gene Screen (TM) Hybridisierungsmembran;

Sartorius (Göttingen):

"Semi-dry" Elektrobloetter;

Schleicher and Schuell GmbH (Dassel):

Polyethylene-backed absorbent paper;

BA 85/22 cellulose;

Membrane Filters (0.45 μm , 82 cm γ);

Sigma Laborzentrifugen GmbH (Osterode am Harz):

2MK Kühlzentrifuge;

Sorvall Instruments (Bad Nauheim):

Sorvall Kühlzentrifuge RC5C mit SS34-, GSA-, GS3- und HB4-Rotoren;

2. CHEMIKALIEN - ENZYME - ANTIKÖRPER

CHEMIKALIEN:

Amersham Buchler GmbH und Co. KG (Braunschweig):

α [^{35}S]-dATP (spezifische Aktivität 22.2 TBq/mmol), α [^{32}P]-dNTP's (110 TBq/mmol) und γ [^{32}P]ATP (185 TBq/mmol);

cDNA synthesis system;

Atlanta Chemie & Handels GmbH (Heidelberg):

Eastman-Kodak Glyoxal, 40% in H_2O ;

BDH Chemical Ltd (Poole, England):
Sodium dodecyl sulfate (SDS);

Bethesda Research Laboratories (Eggenstein):
Agarose electrophoresis grade
Low melting point agarose;

Biomol Feinchemicalien GmbH (Ilvesheim):
Cäsiumchlorid;

BioRad Laboratories GmbH (München):
Acrylamid;
Bio-gel A-5m 100-200 mesh;
Ionenaustauscher Analytical Grade mixed bed resin AG 501-X8(D), 20-50 mesh,
fully regenerated;
Diethylaminoethyl (DEAE) Bio-gel A 100-200 mesh wet;

Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim):
Albumin, Albumin Fraktion V, Chloramphenicol, Dithiothreitol (DTT),
Ethidiumbromid, Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside, Kanamycin-Sulfat, Lambda
II und III Längenmarker (λ -DNA gespalten mit HindIII, und EcoRI + HindIII)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS), dNTP's, 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-
Phosphat, *E. coli* tRNA;

Bonz and Sohn GmbH (Böblingen):
Dextrose;

Carl Roth GmbH (Karlsruhe):
Eisessig;

Collaborative Research Inc. (128 Spring St. Lexington MA):
Oligo dT-Cellulose type 3;

Merck (Darmstadt):
Aminosäuren, Ammoniumacetat, Ammoniumperoxodisulfat (APS),
Ammoniumsulfat, Borsäure, Calciumchlorid, Dimethylsulfoxid, (DMSO), D(+)
Glucosemonohydrat, Isoamylalkohol, Magnesiumchlorid, Methyleneblau, Paraffin

(flüssig), Kaliumazetat, Saccharose, Natriumacetat, Natriumchlorid, Natriumhydroxid, Sorbitol, Titriplex III (Ethylendinitrilotetraessigsäure, EDTA), Harnstoff;

Deutsche Pharmacia GmbH (Freiburg):

Dextransulfat;

Hexadeoxyribonukleotide, # 2166;

Riedel-de Haen AG (Seelze):

Aceton, Chloroform, Ethanol, Glycerin, HCl, Methanol, Phenol, Kaliumacetat, 2-Propanol;

Serva Feinbiochemica GmbH und Co. (Heidelberg):

Agarose SERVA high EEO, N-(2-hydroxyethyl) piperazin-N'-2-ethanesulfonsäure (HEPES), N,N'-Methylenbisacrylamid, Polyethylenglykol (PEG) 6000 und 4000;

Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen):

Ampicillin (Natriumsalz), Heringsperma-DNA Typ XIV, D(+) Galaktose, Gamma-methacryloxypropyl-trimethoxysilan, Ponceau S, Nitroblue Tetrazolium (Natriumsalz);

ENZYME UND ANTIKÖRPER:

Restriktionsenzyme waren von Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim), New England Biolabs (Schwalbach/Taunus) oder Renner GmbH (Dannstadt). Andere Enzyme, bzw. Antikörper wurden von folgenden Firmen bezogen:

Boehringer Mannheim GmbH (Mannheim):

β -Glucuronidase/Arylsulfatase von *Helix pomatia*, Klenow Fragment von *E. coli* Polymerase I, Proteinase K, RNase A, Exonuklease III, alkalische Kälberdünndarmphosphatase;

BRL (Karlsruhe):

Exonuklease VII;

Dakopatts (Hamburg):

Immunglobulinfraktion von Antisera gegen Mäuseimmunglobuline (# Z109);

New England Biolabs (Schwalbach):

T4 DNA Ligase;

T4 DNA Polymerase;

New England Nuclear (NEN) Research Products (Dreieich):

T4 Polynukleotid Kinase;

C-Tailing and Cloning System;

Promega Biotec (Madison Wisconsin):

Goat anti rabbit IgG (Fc), alkalische Phosphatase konjugiert;

Sigma Chemie GmbH (Deisenhofen):

Lysozym; ^

3. MOLEKULARGEWICHTLÄNGENSTANDARDS UND OLIGODEOXYNUKLEOTIDE

DNA-MOLEKULARGEWICHTLÄNGENSTANDARDS (Größen in kb):

λ III	λ II	Φ X174	pBR322xHpaII
λ -Phagen-DNA	λ -Phagen-DNA	Φ X-174-DNA	pBR322
x	x	x	x
EcoRI und	HindIII	HaeIII	HpaII
HindIII			
21.2	23.1	1.353	0.622
5.15	9.41	1.078	0.527
4.97	6.56	0.872	0.404
4.28	4.36	0.310	0.309
3.53	2.32	0.234	0.242
2.03	2.03	0.194	0.238
1.90	0.56	0.118	0.217
1.58	0.13	0.072	0.201
1.33			0.190
0.98			0.180
0.83			0.160/0.160
0.56			0.147/0.147
0.13			0.123
			0.110
			0.090
			0.076
			0.067
			0.034/0.034
			0.026/0.026
			0.015
			0.009/0.009

PROTEINMARKER (BioRad):

Phosphorylase B	92 000 D
BSA	66 200 D
Ovalbumin	45 000 D
Carboanhydrase	31 000 D
Sojabohnen Trypsininhibitor	21 500 D
Lysozym	14 400 D

OLIGODEOXYNUKLEOTIDE:

Oligodeoxynukleotide für Sequenzierreaktionen:

Universalprimer:

Der Universalprimer initiiert Reaktionen, die in lac Z' → lac i' Richtung verlaufen (in pUC und M13 DNAs).

17mer 5' - GTAAAACGACGGCCAGT - 3'

Rückwärtsprimer:

Der Rückwärtsprimer initiiert Reaktionen, die in lac i' → lac Z' Richtung verlaufen (in pUC und M13 DNAs).

16mer 5' - AACGACTATGACCATG - 3'

MM1:

MM1 wurde anhand veröffentlichter, für die CH1-Region des IgG2a kodierenden DNA-Sequenzdaten konstruiert. Der Bereich erstreckt sich von Nukleotidposition 130 bis 147 der von Schreier et al. (1981) beschriebenen Sequenz. Dieser Bereich ist für a- und b-Allel identisch. MM1 wurde für die Suche der die schwere Kette kodierenden cDNA innerhalb der cDNA-Bank benutzt. Darüberhinaus diente es zum Sequenzieren der damit gefundenen cDNA.

18mer 5' - ACCACTGGACAGGGATCC - 3'

MM8:

MM8 initiiert Reaktionen ab Nukleotid 169 vom variablen Bereich der die schwere Kette kodierenden 6A4-DNA in Richtung konstante Region.

19mer 5' - TACTGGATGCACTGGGTAA - 3'

MM9:

MM9 ist komplementär zu MM8 und initiiert Reaktionen ab Nukleotid 151 im variablen Bereich der die schwere Kette kodierenden 6A4-DNA in Richtung signalpeptidkodierende Sequenz.

19mer 5'- TTACCCAGTGCATCCAGTA - 3'

MM10:

MM10 initiiert Reaktionen ab Nukleotid 397 vom konstanten Teil der die leichte Kette kodierenden 6A4-DNA in Richtung des variablen Bereichs.

17mer 5'- GGTGCAGCATCAGCCCG - 3'

Oligodeoxynukleotide für gezielte Mutagenesen (Hybridisierende Bereiche sind unterstrichen):

MM4:

MM4 verbindet die nicht-kodierende *GALI*-Leadersequenz mit dem Translationsstartkodon der die leichte Kette kodierenden 6A4-DNA. Es wurde verwendet, um Vektorsequenzen zwischen den beiden Bereichen zu deletieren und gleichzeitig TATAG zu inserieren. Damit konnte die Promotorsequenz bis einschließlich des Startkodons, wie sie in *S. cerevisiae* vorhanden ist, rekonstruiert werden.

29mer 5'- CTGTGAATCCATTATAGTTTTTCTCCTT - 3'

MM5:

MM5 verbindet die nicht-kodierende *GALI0*-Leadersequenz mit dem Translationsstartkodon der die schwere Kette kodierenden 6A4-DNA. Neben der Deletion von Vektorsequenzen konnten damit die Basen ATATAA inseriert werden.

31mer 5'- ATTTTIGAAAATTCAATATAAATGGAAAGGC - 3'

MM11:

Wurde synthetisiert, um die signalpeptidkodierende Sequenz der 6A4-cDNA gegen diejenige des Killertoxins aus *Kluyveromyces lactis* auszutauschen. Hybridisiert am Übergang des *GALI0*-Promotors und dem Anfang der die schwere Kette kodierenden

6A4-DNA nach dem Ende der signalkodierenden Sequenz.

72mer 5'- AAAATTC AATATAAAATGAATATATTTTACATATTTT
TGTTTTTGCTGTCATTCGTTCAAGGTCAGGTCCAGC - 3'

4. MEDIEN

Bacto peptone, Bacto yeast extract (Hefeextrakt), Bacto agar, Bacto tryptone und Bacto yeast nitrogen base ohne Aminosäuren waren von Difco Laboratories (Dreieich).

N Z. amine A #5NB13 wurden von Otto Aldag GmbH & Co. (Hamburg) bezogen;

4.1. Bakterienmedien

LB (Luria-Bertani) Medium:

10 g Bacto-tryptone

5 g Hefeextrakt

10 g NaCl

H₂O ad 1 Liter

pH mit 0.1 N NaOH auf 7.4 eingestellt;

NZ-Medium:

10 g NZ-Amine

5 g NaCl

5 g Hefeextrakt

1 g Casaminoäuren

2 g MgSO₄ x 7 H₂O

H₂O ad 1 Liter

pH mit 0.1 N NaOH auf 7.4 eingestellt;

M9 Minimalmedium:

6 g	Na ₂ HPO ₄
3 g	KH ₂ PO ₄
0.5 g	NaCl
1 g	NH ₄ Cl

H₂O ad 1 Liter

pH mit 0.1 N NaOH auf 7.4 eingestellt;
autoklavieren und abkühlen lassen; danach Zugabe
nachfolgender Lösungen, die vorher separat
autoklaviert wurden:

2 ml	1 M MgSO ₄
10 ml	20% Glucose
0.1 ml	1 M CaCl ₂

H-Top-Agar:

5 g	Trypton
4 g	NaCl
4 g	Agar

H₂O ad 500 ml

pH mit 0.1 N NaOH auf 7.4 eingestellt,

Für Festmedien wurde 15 g Agar pro Liter zugegeben.

ANTIBIOTIKAKONZENTRATIONEN:

Die Angaben beziehen sich auf die Endkonzentration. Die Vorratslösungen waren 1000-fach konzentriert.

Ampicillin (Lösungsmittel: H₂O):

50 µg/ml	in Flüssigmedien
100 µg/ml	in Festmedien

Tetracyclin (Lösungsmittel: EtOH):

25 µg/ml	in Flüssigmedien
50 µg/ml	in Festmedien

4.2.

Medien für die Anzucht von Hefestämmen

YPD:

- 1% (G/V) Hefeextrakt
- 2% (G/V) Bactopeptone
- 2% (G/V) Dextrose

Minimalmedium:

6.7 g	Yeast Nitrogen Base	
20 ml	Adenin	100 mg/100 ml
10 ml	Uracil	200 mg/100 ml
10 ml	Tryptophan	200 mg/100 ml
10 ml	Histidin	200 mg/100 ml
10 ml	Arginin	200 mg/100 ml
10 ml	Methionin	200 mg/100 ml
30 ml	Tyrosin	100 mg/100 ml
10 ml	Leucin	300 mg/100 ml
10 ml	Isoleucin	300 mg/100 ml
10 ml	Lysin	300 mg/100 ml
10 ml	Phenylalanin	250 mg/100 ml
20 ml	Glutaminsäure	1.0 g/100 ml
10 ml*	Asparaginsäure*	500 mg/100 ml
10 ml	Valin	1.5 g/100 ml
10 ml*	Threonin*	2.0 g/100 ml
10 ml	Serin	3.75 g/100 ml

* wurden separat autoklaviert dazugegeben

H₂O ad 900 ml

Als Kohlenstoffquelle wurde nach dem Autoklavieren je nach Bedarf 100 ml einer autoklavierten 20%igen (G/V) Glukoselösung oder Galaktoselösung zugegeben.

Für die jeweiligen Selektionsplatten bzw. -medien wurde(n) die entsprechende(n) Aminosäure(n) weggelassen.

Für Festmedien wurden 20 g Agar pro Liter zugegeben.

Top-Agar (für Transformationen):

0.3% Agar

1 M Sorbitol

im Selektionsmedium

4.3. Hybridomzellmedium

RPMI+:

500 ml RPMI- Gewebekulturmedium RPMI 1640, Gibco
supplementiert mit 40 ml SC Zusatzmedium folgender Zusammensetzung:

100 ml Pyruvat, (MEM) Gibco 043-1360

100 ml nichtessentielle Aminosäuren, (MEM) Gibco 043-1140

100 ml Penicillin-Streptomycin, Gibco 043-5140

2.92 g Glutamin

36 µl β-Mercaptoethanol

5. VERWENDETE ZELLEN

5.1. Bakterien

Escherichia coli K12:

JM109:

(*recA1*, *endA1*, *gyrA96*, *thi*, *hsdR17*, *supE44*, *relA1*, λ^- ,

$\Delta(lac\ proAB)$), [*F'*, *traD36*, *proAB*, *lacI^qZΔ15*] (Yanisch-Perron, 1985)

5.2. Hefe

Saccharomyces cerevisiae:

F808 (BWG1-7A)

α, *leu2-2*, *leu2-112*, *his4-519*, *ade1-100*, *ura3-52*; (Guarente und Mason, 1983)

5.3. Hybridomzelllinie

B Lymphocyten aus Balb/c Mäusen fusioniert mit Myelomzellen der Linie P3-NS1/1-AG4-1 (kurz NS-1).

6. PUFFER UND LÖSUNGEN

PUFFER (Auswahl der meistgebrauchten):

PBS pH 7.3:

4 mM	KH_2PO_4
16 mM	Na_2HPO_4
115 mM	NaCl

(pH ist durch die Konzentrationen bereits eingestellt)

PBS/PMSF:

PBS mit 0.5 mM PMSF (Phenylmethansulfonylfluorid)

TE:

10 mM	Tris-HCl pH 7.5
1 mM	EDTA pH 7.5

TBE:

0.089 M	Tris
0.089 M	Borsäure
2 mM	EDTA pH 8.0

TBS:

50 mM Tris-HCl pH 8.0

150 mM NaCl

NP40/TBS:

0.1% NP40 in TBS

Formamidauftragspuffer:

98% deionisiertes Formamid (G/G)

0.2% Bromphenolblau (G/V)

0.2% Xylencyanol (G/V)

LÖSUNGEN:

Chloropane:

50% (V/V) Phenol

50% (V/V) Chloroform

0.05% 8-Hydroxychinolin

äquilibriert mit 1/2 Volumen ANE-Puffer:

10 mM NaAc

100 mM NaCl

1 mM EDTA

pH 6.0

Phenol/TE:

50% (V/V) Phenol

0.1% 8-Hydroxychinolin

äquilibriert mit 1/2 Volumen TE Puffer

20 x SSC:

3 M NaCl

0.3 M Na-Citrat

in H₂O

mit 0.1 N NaOH pH auf 7.0 eingestellt

100xDenhardt:

10 g BSA

10 g Ficoll

10 g Polyvinylpyrrolidon

in 500 ml H₂O

RNase A-Lösung (DNase-frei):

10 mg/ml in:

10 mM Tris-HCl pH 7.5

15 mM NaCl

Vor Gebrauch wurde die in dem Puffer gelöste RNase 15 Min gekocht und danach innerhalb 20 Min auf RT abgekühlt.

7. cDNA - KLONIERUNG UND ANALYSE

7.1. Vermehrung von Hybridomzellen

7.1.1. Anzucht der Zellen in Suspensionskultur

Eine 2 ml Vorratskultur, die in flüssigem Stickstoff gelagert wurde, wurde langsam auf Eis aufgetaut und in 20 ml RPMI⁺ suspendiert. Inkubiert wurde bei 37 °C im CO₂ - Brutschrank, wobei die Kulturflasche flach lag. Die Zellzahl wurde im Abstand von 3-4 Tagen durch Volumenvergrößerung auf 5x10³ Zellen/ml eingestellt. Sobald die Gesamtzellzahl von 1 x 10⁷ erreicht war, wurden die Zellen in 50 ml Falconröhrchen 10 Min bei 1 200 UpM (Minifuge GL) und RT abzentrifugiert, der Überstand bei -20 °C eingefroren und das Pellet einmal mit 50 ml physiologischer Kochsalzlösung (0.9% NaCl) gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung aufgenommen und konnten in die pristanbehandelten Mäuse injiziert werden.

7.1.2. Anzucht der Zellen im Aszites und Isolierung monoklonaler Antikörper

Balb/c Mäusen wurde intraperitoneal 0.5 ml Pristan (2,6,10,14-Tetramethylpentadekan) injiziert, um sie zu konditionieren. Dadurch wird die Aszites-Bildung beschleunigt und das Immunsystem supprimiert (Baron und Hartlaub, 1987). Nach einer Woche wurden 10^7 Hybridomzellen, die in 1 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert waren und aus einer Suspensionskultur stammten, ebenfalls in die Bauchhöhle injiziert. Die Tiere wurden beobachtet und in Abständen von 3-6 Tagen, frühestens aber 7 Tage nach der Inokulation, punktiert. Dies geschah bis zu 4 mal, wobei bis zu maximal 5 ml Aszitesflüssigkeit abgenommen werden konnte. Diese Zellsuspension wurde 10 Min bei 1 200 UpM (Minifuge GL) und RT abzentrifugiert, das Zellpellet sofort für die Präparation von RNA eingesetzt, der die monoklonalen Antikörper enthaltende Überstand bei -20 °C eingefroren.

7.2. Vitalfärbung von Zellen mit Trypanblau

Um die Vitalität der Hybridomzellen feststellen zu können, wurden diese in geeigneter Verdünnung in PBS mit 0.04% Trypanblau angefärbt. Das Verhältnis der blauen (vital) zu farblosen (tot) Zellen wurde in einer Thomakammer ermittelt.

7.3. Präparation von Gesamt-RNA (nach Domdey et al., 1984, modifiziert)

Die Angaben beziehen sich entweder auf Zellen aus einer 100 ml Hefezellkultur mit einer OD_{600} von 0.5 - 1.0, die sich in der logarithmischen Phase befinden oder 1×10^8 vitale Hybridomzellen.

Zuerst wurden die Zellen in einem 50 ml Falconröhrchen pelletiert, die Hefezellen durch Zentrifugation für 10 Min bei 4 000 UpM (Minifuge GL) und 4 °C, die Hybridomzellen durch Zentrifugation für 10 Min bei 1 200 UpM (Minifuge GL) und 4 °C. Das Pellet wurde in 10 ml Na-Acetat Puffer suspendiert (50 mM Na-Acetat, 10 mM EDTA pH 5.0). Sofort danach wurde 1 ml 10%ige SDS-Lösung zugegeben. Auf diese Suspension wurde dann 12 ml einer mit obigem Puffer äquilibrierten auf 65 °C vorgewärmten Phenollösung gegeben und 4 Min im 65 °C warmen Wasserbad kräftig geschüttelt. Danach erfolgte eine rasche Abkühlung im Trockeneis-EtOH Gemisch. Wäßrige Phase und Phenolphase wurden durch 10 minütiges Zentrifugieren bei 6 000 UpM (Minifuge GL) und RT getrennt. Die Phenolphase wurde danach von unten mit einer Pipette abgenommen, wobei die Interphase nicht entfernt wurde.

Anschließend erfolgte eine erneute Phenolextraktion wie unter den eben genannten Bedingungen, beginnend mit der Zugabe von 12 ml 65 °C warmem Phenol. Nach der Phasentrennung wurde jedoch die wäßrige Phase von oben abpipettiert und mit gleichem Volumen Chloroform 1 Min lang bei RT geschüttelt. Nach erneuter Phasentrennung wurde nach Abheben der wäßrigen Phase die darin enthaltene RNA mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5.0) und 3 Volumen EtOH für 15 Min bei - 70 °C im Trockeneis präzipitiert und durch Zentrifugation für 10 Min bei 6 000 UpM (Minifuge GL) und 4 °C pelletiert. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet mit 10 ml 70%igem EtOH gewaschen, im Exsikkator getrocknet und anschließend in 300 µl H₂O gelöst. Danach erfolgten noch zwei Umfällungen unter den gleichen Bedingungen im Eppendorfreaktionsgefäß.

Gelagert wurde die RNA entweder als trockenes Pellet bei - 70 °C, oder im Präzipitationsansatz mit EtOH ebenfalls bei - 70 °C.

7.4. Isolierung von poly(A)+RNA (nach Domdey et al., 1984, modifiziert)

0.6 - 0.8 g oligo dT-Cellulose wurden in eine 1.5 x 12 cm Glassäule mit Fritte gefüllt und nacheinander mit 10 ml 0.1 M NaOH, 20 ml H₂O und 50 ml Hochsalzpuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.2% SDS, 5 mM EDTA, 0.5 M NaCl) gewaschen, bzw. equilibriert.

Vor dem Auftragen wurde die Probe in 2.5 ml Elutionspuffer (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 0.2% SDS, 1 mM EDTA) aufgenommen, 3 Min bei 65 °C erwärmt und anschließend rasch abgekühlt. Mit einer 5 M NaCl-Lösung wurde die Salzkonzentration auf 0.5 M Endkonzentration eingestellt. Die RNA-Lösung wurde mit einer Flußrate von einem Tropfen pro 4-7 Sek auf die Säule gegeben. Der Durchfluß wurde aufgefangen und nochmals über die Säule gegeben. Vor dem Eluieren wurde die Säule mit 50 ml Hochsalzpuffer gewaschen, um damit die poly(A)-RNA zu entfernen. Eluiert wurde mit 8 ml Elutionspuffer der in 1 ml Portionen aufgetragen wurde. Das Eluat wurde mit 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5.0) und dem dreifachen Volumen EtOH bei - 20 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 15 Min bei 6 000 UpM (Minifuge GL) und 4 °C wurde das Pellet mit 5 ml 70%igem EtOH gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Nach Aufnahme in 300 µl H₂O wurde noch zweimal umgefällt, bis die Probe zum Schluß in 20 µl H₂O aufgenommen wurde.

Qualität und Menge wurden nach Elektrophorese von 5 µg auf einem 1.3%igem Agarosegel beurteilt.

7.5. Agarosegelelektrophorese (nach Maniatis et al., 1982)

Für die Auftrennung von DNA Fragmenten zwischen 100 - 15 000 bp wurden Gele mit 1.3 - 0.7% Agarose in TBE verwendet.

Nach Einwiegen der entsprechenden Menge Agarose in einen Weithals Erlenmeyerkolben und Zugabe des Puffers, wurde die Agarose in einem Mikrowellenofen bei 750 Watt für 3.5 Min aufgekocht. Nach Abkühlen auf 50 °C und Zugabe von 1/10 000 Volumen 1%iger EtBr-Lösung wurde das Gel in die vorbereitete Form mit Kamm gegossen.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1/6 Volumen Auftragspuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 30% Glycerin in H₂O) gemischt.

Die Elektrophorese wurde bei RT mit einer Spannung von 2-5 V/cm durchgeführt.

Für präparative Zwecke wurde "Low melting point"(LMP)-Agarose mit der halben EtBr-Konzentration eingesetzt. Die Elektrophorese wurde dann bei 4 °C ausgeführt.

Um das in dsDNA interkalierte EtBr sehen zu können, wurde das Gel der Laufkammer entnommen und direkt auf einen Durchlichtkasten mit Licht der Wellenlänge 254 nm gelegt wobei der Farbstoff rot fluoresziert. Fotografiert wurde durch einen Rotfilter mit Blende 11, Belichtungszeit 1/2 Sek und 27 DIN Filmempfindlichkeit.

7.6. Elektrophorese von denaturierter RNA (nach Gordon and McMaster, 1980)

Die RNA wurde in 20 µl Denaturierungspuffer (50% DMSO, 5.8% Glyoxal, 0.2% SDS, 10 mM Natriumphosphatpuffer) für 15 Min bei 50 °C denaturiert, wobei der durch Erwärmung entstandene einzelsträngige Zustand der RNA durch Glyoxalierung der Guaninreste stabilisiert wird.

Bei Einsatz radioaktiv markierter Marker wurde ein Äquivalent von 1 000 - 10 000 cpm glyoxaliert.

Die Proben wurden vor dem Auftragen mit 1 µl einer 1%igen Bromphenolblaulösung versetzt und in einem 1.3%igem Agarosegel (in 10 mM Natriumphosphatpuffer der auch Laufpuffer ist) elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei mußte wegen der geringen Pufferkapazität der Puffer zwischen den beiden Reservoiren durch Umpumpen ständig ausgetauscht werden.

Das Gel konnte nach der Auftrennung ohne weitere Behandlung geblottet werden.

Natriumphosphatpuffer:

0.5 M Na₂HPO₄

0.5 M NaH₂PO₄

pH ist dadurch auf ca. 6.5 festgelegt

7.7. Southern-Blot (nach Maniatis et al., 1982)

Nach der Elektrophorese wurden die DNA im Agarosegel unter leichtem Schwenken 30 Min in 1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH denaturiert und anschließend 30 Min in 1.5 M NaCl, 1 M Tris HCl pH 8.0 neutralisiert.

Der Blot wurde in folgender Reihenfolge - in einer Wanne - von unten nach oben aufgebaut:

- Schaumstoff (ca. 3-4 cm stark)
- 3 Whatman 3MM™ Papiere
- Agarosegel (wie oben vorbehandelt)
- Nylon-Filter, getränkt mit 2 x SSC
- 3 Whatman 3MM™ Papiere getränkt mit 2 x SSC
- 5-10 trockene Whatman 3MM™ Papiere
- 10-15 cm saugfähiges Papier
- Gewicht (ca. 0.5 kg)

Danach wurde die Wanne bis in dreiviertel Höhe des Schaumstoffs mit 10 x SSC gefüllt. Nach 6 Std oder über Nacht wurde der NC-Filter 2 Std im Vakuumofen bei 80 °C gebacken oder 2-3 Min mit einer 12 W leistenden UV-Lampe der Wellenlänge 254 nm aus 7 cm Entfernung bestrahlt.

Der in dieser Art präparierte Filter konnte so für Hybridisierungen eingesetzt werden.

7.8. Northern-Blot

Art und Aufbau des Northern-Blot waren mit dem des Southern-Blots, abgesehen von folgenden Ausnahmen, identisch: Die glyoxalierte und damit bereits denaturierte RNA im Agarosegel wird nicht vorbehandelt. Statt 10 x SSC bzw. 2 x SSC wurde 20 x SSC benutzt und 16 - 48 Std geblottet. Außerdem durfte auf das Backen nicht verzichtet werden, da hierbei die Glyoxalierung rückgängig gemacht wird. Nach dem Backen war der Filter für Hybridisierungen einsetzbar.

Die verwendeten Oligodeoxynukleotide wurden von Dr. Ronald Mertz auf einem automatisierten DNA Synthesizer der Firma Applied Biosystems mit der Phosphoamidit Methode synthetisiert.

Die fertigen Oligodeoxynukleotide lagen als Lyophilisat ohne Tritylgruppe vor und wurden in jeweils 100 µl H₂O gelöst.

Zur Reinigung wurde ein 20 x 20 x 0.15 cm Gel mit 16% Polyacrylamid (29 : 1, Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid), 8 M Harnstoff in TBE verwendet. Zu 50 ml dieser Lösung wurden zum Polymerisieren 250 µl einer 10%igen Ammoniumperoxodisulfatlösung in H₂O und 50 µl TEMED gegeben. Die Taschen waren 2 cm breit. Pro Tasche wurden 20 µl der Oligodeoxynukleotidlösung (ca. 60 µg Oligodeoxynukleotid) mit 20 µl Formamidauftragspuffer aufgetragen. Der Lauf wurde bei 30 Watt solange durchgeführt bis das Bromphenolblau mindestens 3/4 der Gellänge zurückgelegt hatte. Danach wurden die Platten voneinander getrennt und das Gel in Frischhaltefolie eingeschlagen. Um die Oligodeoxynukleotidbande lokalisieren zu können, wurde das Gel auf eine Dünnschichtchromatographieplatte mit Fluoreszenzindikator gelegt und von oben mit UV Licht der Wellenlänge 254 nm beleuchtet. Dort wo Oligodeoxynukleotide durch Absorption des UV-Lichts das Fluoreszieren der Dünnschichtplatte verhinderten, wurde der entsprechende Bereich aus dem Gel ausgeschnitten und zum Homogenisieren durch eine Spritze, deren Mündung durch Einschmelzen verengt worden war, gepreßt. Das Homogenisat wurde mit 1 ml H₂O versetzt und 4 Std bei 37 °C geschüttelt. Danach wurde der gesamte Ansatz in eine 1 ml Spritze gefüllt, deren Mündung zuvor von Innen durch Verstopfen mit silikonisierter Glaswolle für Gelfragmente unpassierbar gemacht wurde. Die Spritze wurde nun in ein Greiner Zentrifugenröhrchen gestellt und 5 Min bei 3 000 UpM und RT in der GL Minifuge zentrifugiert. Das Volumen der Oligodeoxynukleotidlösung wurde durch mehrmaliges Ausschütteln mit n-Butanol auf ein Volumen von ca. 100 µl eingengt. Vor dem Präzipitieren wurde noch mit einem Volumen Ether ausgeschüttelt. Die wässrige Phase wurde für die Fällung des Oligodeoxynukleotids mit 1/10 Vol. 3 M Natriumacetat (pH 5.0), 1/100 Vol. 1 M MgCl₂ und 3 Vol. EtOH gemischt. Nach 15 Min bei -70 °C wurde die Probe 10 Min bei 13 000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Um Reste von Harnstoff quantitativ zu entfernen wurde die Fällung stets zweimal wiederholt.

Zum Verwenden und Aufbewahren wurde das Oligodeoxynukleotid in TE gelöst. Die Konzentration wurde nach Bestimmung der OD₂₆₀ auf 1 mg/ml eingestellt.

7.10. [³²P]-Endmarkierung von Oligodeoxynukleotiden (nach Maxam and Gilbert, 1980, modifiziert)

Oligodeoxynukleotide können mit T4 Polynukleotidkinase und γ [³²P]ATP an ihrer 5'OH-Gruppe radioaktiv markiert werden.

Die Reaktion wurde für 20 Min bei 37 °C mit 10 pmol Oligodeoxynukleotid, 100 μ Ci γ [³²P]ATP und 4U T4 Polynukleotidkinase im Kinasepuffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT, 0.1 mM Spermidin) durchgeführt. Danach wurden nochmals 4U T4 Polynukleotidkinase dazugegeben und erneut für 20 Min bei 37 °C inkubiert. Die Reaktion wurde anschließend durch 10 Min Inkubation bei 70 °C gestoppt.

Das Abtrennen des γ [³²P]ATP von den markierten Oligodeoxynukleotiden erfolgte durch Chromatographie über eine DEAE-Ionenaustauschersäule. Zunächst wurden 0.1 - 0.2 ml Säulenmaterial in einer BioRad Econocolumn mit 5 x 1 ml 0.2 M NTE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.2 M NaCl) äquilibriert. Die Probe wurde in 1 ml 0.2 M NTE aufgenommen und auf die Säule aufgetragen. Danach wurde noch freies γ [³²P]ATP mit 5 x 1 ml 0.2 M NTE herausgewaschen. Das markierte Oligodeoxynukleotid wurde mit 0.2 ml Aliquots 0.5 M NTE (10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM EDTA, 0.5 M NaCl) eluiert und anschließend im Szintillationszähler gemessen. Die 2. und 3. Fraktion enthielten im allgemeinen den Hauptanteil der markierten Oligodeoxynukleotide.

Die Proben wurden nicht länger als zwei Wochen verwendet und bei -20 °C gelagert.

7.11. [³²P] Markierung doppelsträngiger DNA Fragmente (nach Feinberg und Vogelstein, 1984, modifiziert)

Das Prinzip der Methode beruht auf der *de novo* Synthese eines DNA Stranges in Gegenwart von α [³²P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml). Matrize ist eine durch Hitze zum Einzelstrang denaturierte Doppelstrang-DNA. Die Polymerasereaktion wird durch ein Hexadeoxyribonukleotidgemisch zufälliger Zusammensetzung initiiert.

Das zu markierende DNA-Fragment wurde zunächst in einem LMP-Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt, herausgeschnitten und mit 3 ml H₂O pro Gramm Gel 7 Min gekocht. Davon wurde für die Reaktion ein 30 bis 50 ng enthaltendes Äquivalent abgenommen mit 50 μ Ci α [³²P]-dCTP und 2U Klenow-Polymerase in 50 μ l Puffer (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 5 mM MgCl₂, 0.02 mM dATP, 0.02 mM dTTP, 0.02 mM dGTP, 0.2 M HEPES pH 6.6, 9 μ mol Hexadeoxyribonukleotide) für 2-5 Std bei RT inkubiert. Die Reaktion wurde mit 200 μ l 20 mM NaCl, 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 2 mM EDTA, 0.25% SDS und 1 mM dCTP gestoppt.

Nichteingegebauete Nukleotidtriphosphate wurden über eine Biogel A5m Säule (BioRad) abgetrennt. Dazu wurde eine Pasteurpipette mit silikonisierter Glaswolle an ihrer Verjüngung verstopft, mit Säulenmaterial bis zur Einkerbung am oberen Ende gefüllt und mit 5 ml TE äquilibriert. Die Probe wurde aufgetragen und mit TE eluiert, wobei das Eluat in 200 µl Fraktionen in Eppendorfreaktionsgefäßen aufgefangen wurde. Durch Zählen der Fraktionen im Szintillationszähler wurden diejenigen ermittelt, welche die markierten Proben enthielten.

Die vier Fraktionen mit den meisten cpm wurden vereinigt und konnten so in Hybridisierungen eingesetzt oder für maximal 2 Wochen bei -20 °C aufgehoben werden.

7.12. Hybridisierung mit [³²P]-endmarkierten Oligodeoxynukleotiden

Die Nylonfilter der Southern- oder Northern-Blots wurden 2 Std bei 65 °C in Vorhybridisierungslösung (6 x SSC, 0.2% SDS, 10 x Denhardts) inkubiert, wobei sie vollkommen von der Lösung benetzt waren.

Für die Hybridisierung wurden pro 50 cm² Filter 1 ml einer Lösung aus 6 x SSC, 0.2% SDS, 5xDenhardts mit 10 000 bis 1 000 000 cpm radioaktiv markierter Probe verwendet. Der Ansatz wurde in einem Falconröhrchen (50 ml), das um seine Längsachse gedreht wurde, für 5 - 18 Std bei 37 °C inkubiert. Maximal wurden 10 Filter mit insgesamt 500 cm² in einem Röhrchen hybridisiert.

Die Filter wurden anschließend 2 x 2 Min bei RT in 6 x SSC, 0.1% SDS gewaschen, danach 1 x 15 Min bei einer um 15 °C unter dem berechneten Schmelzpunkt des Oligodeoxynukleotids gelegenen Temperatur in gleichartig zusammengesetzter Lösung.

Für die Berechnung des Schmelzpunktes wurden 2 °C für jedes A-T Paar, 4 °C für jedes G-C Paar zugrundegelegt, wobei diese Rechnung näherungsweise nur für Oligodeoxynukleotide einer Länge von 13 - 23 Basen gültig ist. Die Waschttemperatur mußte daher gegebenenfalls in 2-5 °C Abstufung für jedes Experiment individuell verändert werden.

Die noch feuchten, in Frischhaltefolie eingeschlagenen Filter wurden bei -70 °C für 1 - 16 Stunden (oder länger) exponiert.

7.13. Hybridisierung mit [^{32}P]-markierten DNA-Fragmenten

Die vorbehandelten Nylonfilter der Southern- und Northern-Blots wurden 1 Std bei 50 °C und anschließend 1 Std bei 37 °C in 3 ml Vorhybridisierungslösung pro 50 cm² Filter inkubiert, wobei die Filter vollkommen von der Lösung benetzt waren.

Vorhybridisierungslösung:

50% Formamid

5 x SSC

50 mM Natriumphosphatpuffer ($\text{NaH}_2\text{PO}_4:\text{Na}_2\text{HPO}_4 = 1:1$)

5 x Denhardts

0.1mg/ml gescherte Heringesperma DNA

Für 50 cm² Filter wurden 1 ml Hybridisierungslösung mit 10 000 bis 100 000 cpm radioaktiv markierter Probe verwendet. Der Ansatz wurde in einem Falconröhrchen (50 ml), das um seine Längsachse gedreht wurde, für 16 - 24 Std bei 42 °C inkubiert. Maximal wurden 10 Filter mit insgesamt 500 cm² in einem Röhrchen hybridisiert.

Die Filter wurden 2 x 10 Min bei RT in 2 x SSC, 0.1% SDS, 2 x 10 Min bei 55 °C in 2 x SSC, 0.1% SDS und 2 x 10 Min bei 55 °C in 0.1 x SSC, 0.1% SDS gewaschen .

Die noch feuchten, in Frischhaltefolie eingeschlagenen Filter wurden mit Verstärkerfolie bei - 70 °C für 1 - 16 Std (oder länger) exponiert.

7.14. Abwaschen hybridisierter Oligodeoxynukleotid - Proben von NC-Filtern (nach Thomas, 1980)

Sollten Nylonfilter, die bereits mit markierten Oligodeoxynukleotiden hybridisiert worden waren für eine Hybridisierung mit einer anderen Probe verwendet werden, so wurden sie 2 Std bei 80 °C und 120 UpM mit 1 x Waschpuffer (5 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.2 mM EDTA, 0.05% Natriumpyrophosphat, 16.7 x Denhardts) gewaschen. Um das Entfernen der radioaktiven Proben vom Filter zu überprüfen, wurden sie über Nacht bei - 70 °C autoradiographiert.

7.15. cDNA Synthese (nach Amersham Manual)

Es wurden 2 cDNA-Synthesen durchgeführt, wovon in der ersten der erste Strang, in der zweiten der zweite Strang radioaktiv markiert wurde. Als Kontroll mRNA wurden 0.5 µg Kaninchen Globin mRNA aus Retikulozyten Polysomen verwendet.

Das Reaktionsgemisch für den ersten Strang enthält:

	Probe	Kontrolle
1. Strang 5-fach Puffer (Amersham)	10.0 µl	4.0 µl
Natriumpyrophosphat (Amersham)	2.5 µl	1.0 µl
Ribonukleaseinhibitor aus humaner Plazenta (25 U/µl)	2.5 µl	1.0 µl
dNTP's (10 mM dATP, 10 mM dGTP, 10 mM dTTP, 5 mM dCTP)	5.0 µl	2.0 µl
α [³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	1.0 µl	1.0 µl
poly(A)+RNA	5.0 µg	0.5 µg
H ₂ O	27.0 µl	9.0 µl
Gesamtvolumen	48.0 µl	18.0 µl

Der Ansatz wurde vorsichtig gemischt, kurz abzentrifugiert und nach Zugabe von 20 U (2 µl) Reverser Transkriptase für 50 Min bei 40 °C inkubiert. Der Parallelansatz für die Markierung des zweiten Stranges enthielt kein α [³²P]-dCTP, dafür 1 µl mehr H₂O.

Das Reaktionsgemisch für den zweiten Strang enthält:

	Probe	Kontrolle
Reaktion erster Strang	50.0 µl	20.0 µl
2. Strang - Puffer (Amersham)	93.5 µl	37.5 µl
α [³² P]-dCTP (3000 Ci/mmol, 10 mCi/ml)	1.0 µl	1.0 µl
<i>E. coli</i> Ribonuklease H (0.8 U/µl)	5.0 µl	1.0 µl
<i>E. coli</i> DNA Polymerase I (3.5 U/µl)	33.0 µl	6.5 µl
H ₂ O	67.5 µl	34.0 µl
Gesamtvolumen	250.0 µl	100.0 µl

Bei dieser Synthese wurde α [³²P]-dCTP nur in diejenige Reaktion gegeben, bei welcher der erste Strang nicht radioaktiv markiert worden war. Nach vorsichtigem Mischen wurden die Proben zunächst für 60 Min bei 12 °C, danach für weitere 60 Min bei 22 °C inkubiert. Die Reaktionen wurden durch Erhitzen für 10 Min bei 70 °C gestoppt. Danach wurden die Proben

kurz abzentrifugiert und je 1.5 µl T4 DNA Polymerase (=600U) dazupipettiert. Nach 10 Min Inkubation bei 37 °C wurden die Reaktionen mit 25 µl 0.25 M EDTA und 25 µl 10%iger SDS - Lösung gestoppt.

Nach jeder der mit Radioaktivität durchgeführten Reaktionen wurden 2 x 2 µl des jeweiligen Ansatzes entnommen, um Menge und Länge der Syntheseprodukte zu messen:

2 µl wurden mit 18 µl 0.2 M EDTA gemischt, wovon je 5 µl auf die Mitte eines Whatman DE 81 Papierscheibchens (Ø~2 cm) pipettiert wurden. Einer der beiden Filter wurde anschließend 6 x 5 Min mit 0.5 M Na₂HPO₄, 2 x 1 Min in H₂O und 2 x 1 Min in 95%igem EtOH gewaschen. Nach dem Trocknen wurden beide Filter im Szintillationszähler gemessen. Aus dem Verhältnis der cpm des gewaschenen und des nichtgewaschenen Filters ließ sich die prozentuale Einbaurate von Nukleotiden berechnen. Mit dieser und anhand der bekannten dCTP Konzentration konnte sodann die Menge an synthetisierter DNA ermittelt werden.

Die anderen 2 µl wurden im Falle des ersten Stranges auf einem Glyoxalgel, im Falle des zweiten Stranges auf einem nichtdenaturierenden Agarosegel aufgetrennt. Nach der Elektrophorese wurden die Gele auf ein Whatman DE 81 Papier gelegt, mit Frischhaltefolie abgedeckt und 2 Std bei 60 °C im Geltdrockner getrocknet. Anschließend wurden sie autoradiographiert.

Probe und Phenol/TE wurden zu gleichen Teilen gemischt. Durch Zentrifugieren für eine Minute wurden die Phasen getrennt. Die wässrige Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und erneut phenolextrahiert. Die wässrige Phase wurde danach mit dem gleichen Volumen Chloroform ausgeschüttelt, die Phasen durch einminütiges Zentrifugieren getrennt, die untere Phase abgenommen und nochmals in der gleichen Weise behandelt.

Nach der Zugabe von einem Volumen 4 M Ammoniumacetat und des doppelten Volumens EtOH wurden die Nukleinsäuren bei - 70 °C präzipitiert. Nach zehnmütigem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Pellet in 50 µl TE gelöst. Es wurde nochmals, nach Zugabe von 50 µl 4 M Ammoniumacetat und 200 µl EtOH, für 10 Min bei - 70 °C gefällt. Anschließend wurde für 2 Min zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen und das Pellet für 3 Min im Exsikkator getrocknet. Die doppelsträngigen cDNAs wurden in je 25 µl H₂O gelöst. Bis zur weiteren Verwendung wurden sie bei -20 °C gelagert.

7.16. Verknüpfung der cDNA mit dem Vektor (nach NEN Manual)

Soll doppelsträngige cDNA mit einem mit PstI gespaltenen, an seinen 3'-Enden mit Homopolymer-Schwänzen (Poly dG) versehenen pBR322 (kurz poly-dG-Vektor) verknüpft werden, so muß die cDNA in einer durch die terminale Deoxynukleotidyl-Transferase katalysierten Reaktion mit Homopolymer-Schwänzen (Poly dC₁₀₋₂₀) versehen werden (kurz poly-dC-cDNA).

Die cDNA, deren Synthese in den vorangegangenen Kapiteln beschrieben wurde, hat glatte Enden. Für die Ausbildung der mit dem beschriebenen poly-dG-Vektor gewünschten rekombinanten DNA-Moleküle mußte die cDNA daher mit einem dC-Schwanz versehen werden.

Anpolymerisieren der dC-Schwänze:

Zu doppelsträngiger, glattendiger cDNA in 48 µl Reaktionspuffer (140 mM Natriumcacodylat pH 7.0, 1.2 mM β-Mercaptoethanol, 0.01 mM dCTP, 1 mM Kobaltchlorid) wurden nach 10 minütiger Vorinkubation bei 15 °C 2 µl (10U) terminale Desoxynukleotidyl-Transferase dazupipettiert und anschließend 60 Min bei der gleichen Temperatur weiterinkubiert. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 50 µl Stopppuffer (40 mM EDTA, 600 mM NaAc pH 7.5).

Anschließend wurde mit Phenol/TE extrahiert. Die H₂O - Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit der gleichen Menge Ether gemischt. Die Phasen wurden abermals durch einminütiges Zentrifugieren getrennt. Die H₂O - Phase wurde danach in derselben Weise nochmals ausgeethert. Der Restether wurde durch vorsichtiges Überströmen der Probe mit Stickstoff entfernt. Nach Zugabe des dreifachen Volumens EtOH wurde die DNA bei - 70 °C gefällt und durch Zentrifugieren für 10 Min pelletiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 340 µl H₂O aufgenommen.

Verknüpfungsreaktion:

Das molare Verhältnis poly-dC-cDNA : poly-dG-Vektor betrug zwischen 1 : 2 und 5 : 1.

Das Annealingvolumen wurde stets so gewählt, daß die Gesamtkonzentration an DNA 1 - 5 µg/ml betrug.

Zu 170 µl poly-dC-cDNA wurden 20 µl Annealing - Puffer (NEN) und 10 µl (25 ng/µl) poly-dG-Vektor (NEN) gegeben.

Die Ansätze wurden der Reihe nach bei folgenden Temperaturen inkubiert: 10 Min bei 70 °C, 90 Min bei 56 °C, 90 Min bei 42 °C und 20 Min bei RT.

Aus jeder der Reaktionen wurden je 20 µl zu 200 µl transformationskompetenten *E. coli* JM109 Zellen gegeben. Nach der Erholungsphase wurde jeder Transformationsansatz auf 3 LB/Tc-Platten (Ø = 8 cm) ausplattiert.

7.17. Koloniehybridisierung - Screenen der cDNA Bank (nach Woods, 1984, modifiziert; Maniatis et al., 1982, modifiziert)

Um Transformanden mit der gewünschten Insertion finden zu können, wurden Kolonien in Mikrotiterplatten (mit 96 Vertiefungen), die pro Vertiefung 150 µl LB-Medium und das entsprechende Selektionsantibiotikum enthielten, überimpft. Die Platten wurden über Nacht bei 37 °C und 100 UpM inkubiert. Mit einem Aluminiumstempel, dessen 48 Zinken in die Hälfte der Vertiefungen einer Mikrotiterplatte passen, wurden die Kulturen auf NC-Filter überstempelt. Die NC-Filter waren zuvor auf LB/Tc-Platten gelegt worden. Die Platten wurden für 4-8 Std bei 37 °C inkubiert.

Für die Konservierung der cDNA-Bank wurde in jede Vertiefung 50 µl Glycerin pipettiert und gut gemischt. Nach Aufsetzen der Abdeckplatte und Abdichten mit Parafilm, wurde die cDNA-Bank bei -70 °C aufbewahrt. Auf diese Art konservierte Bakterienkulturen sind über mehrere Jahre hinweg rekultivierbar. Sollte es sich als notwendig erweisen auf die Kulturen zurückgreifen zu müssen, so konnte mit der heißen Impföse oder dem ganzen Stempel aus den ständig auf -70 °C gehaltenen Platten Impfmaterail auf ein frisches Medium übertragen werden.

Nach der Inkubation der NC-Filter wurden diese von den Platten abgenommen und zum Denaturieren mit den Kolonien auf der Oberseite für 10 Min auf ein mit 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl getränktes Whatman 3MM™-Papier gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, daß keine Flüssigkeit auf die Oberseite der Filter gelangte. Danach wurden sie zum Entfernen überschüssiger Denaturierungslösung kurz auf ein frisches Whatman 3MM™-Papier gelegt bevor sie auf einem mit 1 M Tris-HCl (pH 7.0), 1.5 M NaCl getränktem Whatman 3MM™-Papier 2-4 Min neutralisiert wurden.

Anschließend wurden die Filter 20-30 Sek in 3 x SSC geschwenkt und auf trockenes Whatman 3MM™-Papier gelegt, um sie dann für 1-2 Std im Vakuum bei 80 °C zu "backen". Nach dem Backen wurde nichtgebundenes Bakterienmaterial durch Waschen für 16-20 Std in 3 x SSC, 0.1% SDS bei 65 °C entfernt. Die Filter wurden in dieser Form für Hybridisierungen verwendet.

7.18. Minipräparation von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (nach Maniatis et al., 1982, modifiziert)

5 ml LB-Medium mit dem entsprechendem Antibiotikum wurde mit einer Kolonie angeimpft und über Nacht bei 37 °C, 180 UpM inkubiert.

1.5 ml dieser Kultur wurden jeweils in einem Eppendorfreaktionsgefäß für 1 Min bei RT zentrifugiert, der Überstand verworfen. Das Pellet wurde in 100 µl Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mg/ml Lysozym, jedesmal frisch angesetzt) suspendiert und 5 Min bei RT inkubiert. Danach wurden 200 µl Lösung II (0.2 N NaOH, 0.1% SDS, jedesmal frisch angesetzt) dazupipettiert, das Gefäß verschlossen und 3 mal scharf geschüttelt. Nach 5 Min auf Eis wurden 150 µl 3 M NaAc (pH 5.0) dazugegeben und vorsichtig gemischt. Nach weiteren 5 Min auf Eis wurde für 5 Min bei RT zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt. Zu der Lösung wurde ein äquivalentes Volumen an Chloroform gegeben und 1 Min im Eppendorscheüttler geschüttelt. Phasentrennung erfolgte bei RT in der Zentrifuge. Die H₂O-Phase wurde in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt und mit 2-fachem Volumen EtOH gemischt. Nach 2 Min Stehenlassen bei RT wurden die präzipitierten Nukleinsäuren 5 Min bei RT abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde nach dem Waschen mit 1 ml 70%igem EtOH im Exsikkator getrocknet und in 50 µl TE gelöst. 10 µl dieser Lösung reichten - sofern es sich um einen "Multicopy"-Vektor handelte - für eine Restriktionsendonukleasespaltung aus.

7.19. Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterienzellen (nach Maniatis et al., 1982, modifiziert)

5 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum wurden mit einer Kolonie inokuliert und mit 180 UpM bei 37 °C über Nacht geschüttelt.

200 ml LB-Medium in einem 1 l Erlenmeyerkolben, einschließlich des entsprechenden Selektionsantibiotikums wurden mit 1 ml obiger Vorkultur angeimpft und unter gleichen Bedingungen wie diese inkubiert.

Die Zellen wurden in einem GS3 Rotor (Sorvall) 10 Min bei 7 000 UpM und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in 4 ml Lösung I (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA, 5 mg/ml Lysozym, jedesmal frisch angesetzt) gut suspendiert, sofort in ein SS34 (Sorvall) Zentrifugenröhrchen überführt und 5 Min bei RT inkubiert.

Nach Zugabe von 8 ml Lösung II (0.2 N NaOH, 0.1% SDS, jedesmal frisch angesetzt) wurde das Röhrchen verschlossen und die Probe geschwenkt.

Nach 10 Min auf Eis wurde die Probe mit 6 ml 3 M NaAc (pH 5.0) gut gemischt und nochmals 10 Min auf Eis stehen gelassen.

Die anschließende Zentrifugation wurde für 15 Min bei 20 000 UpM und 4 °C durchgeführt (SS34, Sorvall), der Überstand mit 18 ml Chloropane in einem Falconröhrchen extrahiert.

Die Phasentrennung erfolgte durch Zentrifugation (Minifuge GL) bei 6 000 UpM und RT.

Die H₂O-Phase wurde in ein Corex-Röhrchen, in das 9.5 ml Isopropanol vorgelegt waren, überführt und gemischt.

Die dabei nach 10 Min bei RT ausgefallenen Nukleinsäuren wurden durch 15 minütige Zentrifugation im HB4-Rotor (Sorvall) bei RT und 10 000 UpM pelletiert.

Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit 10 ml 70%igem EtOH gewaschen, im Exsikkator getrocknet und in 1.5 ml TE gelöst.

Nach Zugabe von 1.8 g CsCl und 120 µl 1%igem EtBr wurde die Lösung in ein TLV100-Zentrifugenröhrchen gefüllt.

Die Ultrazentrifugation wurde mit 100 000 UpM in der TL 100 Ultrazentrifuge, bei 20 °C für 2 Std 45 Min durchgeführt.

Das Abziehen der Plasmidbande erfolgte mit einer 1 ml Spritze bei UV-Licht der Wellenlänge 254 nm.

Die Extraktion des EtBr wurde durch Ausschütteln mit dem äquivalenten Volumen an CsCl-gesättigtem Isopropanol solange fortgesetzt bis die Lösung farblos war. Gelegentlich ausfallendes CsCl wurde durch tropfenweise Zugabe von TE wieder in Lösung gebracht.

Nach Ermittlung des Volumens und der Zugabe von 2.5 Volumen EtOH (RT) wurde die DNA 30 Min bei 4 °C gefällt. Danach erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 13 000 UpM und 4 °C in der Eppendorfzentrifuge. Nach Waschen des Pellets mit 1 ml 70%igem EtOH und Trocknen im Exsikkator wurde dieses in 300 µl TE gelöst und noch zweimal gefällt: Dazu wurden 1/10 Vol. 3 M NaAc (pH 5.0) und 2.5 Vol. EtOH nacheinander zugegeben, gemischt und 10 Min auf Trockeneis stehen gelassen. Danach erfolgte eine 10 minütige Zentrifugation bei 13 000 UpM und 4 °C in der Eppendorfzentrifuge. Nach Waschen des Pellets mit 1 ml 70%igem EtOH und Trocknen im Exsikkator wurde dieses in 300 µl TE gelöst und der Vorgang ab Zugabe des NaAc und EtOH wiederholt. Schließlich wurde das Pellet in 150 µl TE aufgenommen und die optische Dichte bei 260 nm (OD₂₆₀) gemessen. Die OD₂₆₀=1.0 entspricht bei 1 cm Schichtdicke einer Nukleinsäurekonzentration von 50 µg/ml.

Die durchschnittlich isolierte Menge für pUC-Plasmide und deren Derivate betrug 800-1600 µg.

7.20. Restriktionsendonukleasespaltungen von DNA (Chakraborty, pers. Mitteilung)

Alle Restriktionsendonukleasespaltungen wurden in dem Puffer folgender Zusammensetzung durchgeführt:

33 mM	Tris-Acetat, pH 7.8
66 mM	K-Acetat, pH 7.8
10 mM	Mg-Acetat, pH 7.8
0.5 mM	DTT
0.1 mg/ml	BSA

Das Volumen eines jeden Ansatzes wurde so klein wie möglich gehalten. Dies war abhängig von der Enzym- bzw. DNA-Konzentration, wobei der Anteil des Enzymvolumens nicht mehr als 1/10 des Gesamtvolumens betrug.

Von der zu spaltenden DNA wurde für die Reaktion soviel μg eingesetzt, daß sich pro zu erwartendem Fragment Mengen von 20-200 ng ergaben. Der Spaltpuffer wurde in Form einer 10-fach konzentrierten Lösung zugegeben.

Die Reaktion wurde mit 2-10 U Enzym pro μg DNA für 1 Std bei 37 °C durchgeführt.

Wurden DNAs aus Minipräparationen gespalten, so wurden zusätzlich noch 0.5 μl einer 10 mg/ml RNase A enthaltenden Lösung vor der Inkubation in den Ansatz gegeben.

Vor dem Auftragen auf Agarosegele wurden die Proben mit 1/10 Volumen Auftragspuffer (0.25% Bromphenolblau, 0.25% Xylencyanol, 30% Glycerin in H_2O) versetzt.

7.21. Partialsplaltung von DNA (nach Maniatis et al., 1982)

Bisweilen werden DNA-Fragmente benötigt, die nur mit Restriktionsenzymen gespalten werden können, die auch innerhalb des Fragments eine Erkennungssequenz für dasselbe Restriktionsenzymen enthalten. Durch unvollständige Reaktion wird die DNA statistisch nicht an allen Erkennungsstellen geschnitten, sodaß unter den entstandenen Reaktionsprodukten auch das gesuchte Partialfragment vorhanden ist.

Zum Zweck der Partialsplaltung wurde die Reaktion mit verschiedenen Enzymkonzentrationen durchgeführt. Außer der Zeit, die auf eine halbe Stunde reduziert war, gleichen die Bedingungen denen, die im obigen Kapitel für Restriktionsspaltungen angegeben sind. Die Enzymkonzentration wurde dabei stufenweise, von 5U/ μg DNA bis auf 0.09U/ μg DNA reduziert. Nach der Reaktion wurden die Reaktionsprodukte auf

LMP-Agarosegel analysiert, das gewünschte Fragment isoliert und in Ligationsreaktionen eingesetzt.

7.22. Auffüllreaktion von versetzten DNA-Enden mit Klenow-Polymerase (nach Maniatis et al., 1982)

Liegen zwei bezüglich ihrer Sequenzen nichtkompatible DNA-Enden mit 3'-zurückversetzten OH-Gruppen vor, und sollen diese miteinander ligiert werden, so müssen sie zunächst mit Klenow-Polymerase und Deoxynukleotridtriphosphaten zu glatten Enden aufgefüllt werden.

Die Reaktion wurde mit in TE gelöster DNA in 15 µl Gesamtvolumen für 15 Min bei RT durchgeführt. Der Ansatz enthielt neben der Probe 100 mM HEPES (pH 7.5), 6.6 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 1 mM β-Mercaptoethanol, 0.5 mM von jedem dNTP, 4 mM DTT und 2U Klenow-Polymerase. Für weitere Versuche wurde die DNA entweder phenolextrahiert und ethanolpräzipitiert, oder direkt in Ligationsreaktionen eingesetzt.

7.23. Abspaltung der 5'-Phosphatreste von DNA-Molekülen mit alkalischer Phosphatase (nach Angaben des Herstellers, Boehringer)

Bei Restriktionsendonukleasespaltungen von DNAs entstehen am 3'-Ende eine Hydroxylgruppe und am 5'-Ende ein Phosphatrest. Um bei Klonierungen die Rezirkularisierung von Vektoren mit symmetrischen Enden ohne die Aufnahme exogener DNA zu unterbinden, oder um 5'-Endmarkierungen von DNA-Fragmenten durchführen zu können, ist das Vorhandensein einer freien 5'-OH-Gruppe notwendig. Diese kann durch Abspalten des Phosphatrests mit alkalischer Kälberdünndarmphosphatase generiert werden. 50 pmol freie 5'-Phosphatenden wurden in 50 µl 1 x Puffer (0.05 M Tris-HCl pH 8.0, 0.1 mM EDTA) mit 0.5U Kälberdünndarmphosphatase (20 U/µl, in 1 x Puffer verdünnt) erst 30 Min bei 37 °C danach für 30 Min bei 50 °C inkubiert.

Die Inaktivierung des Enzyms erfolgte nach Zugabe von 1/10 Volumen 100 mM Trinitriiloessigsäure (Natriumsalz) und 45 Min Inkubation bei 65 °C. Nach Erhöhung des Volumens mit TE auf 200 µl wurde mit gleichem Volumen Chloropane ausgeschüttelt und die Phasen durch Zentrifugieren getrennt. Die H₂O-Phase wurde mit 1/10 Volumen 3 M NaAc pH 5.0 und 2.5-fachem Volumen EtOH gemischt und 15 Min bei -70 °C stehen gelassen. Pelletiert wurde die DNA für 10 Min bei 4 °C und 13 000 UpM. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen, im Exsikkator getrocknet und so in TE aufgenommen, daß sich eine Endkonzentration von 0.1 mg/ml ergab.

7.24. Ligation DNA-DNA (nach Maniatis et al., 1982)

Sollte ein DNA-Fragment in einen entsprechend geschnittenen Vektor inseriert werden, so wurde mit dem dreifachen molaren Überschuß an Fragment-DNA gearbeitet. Bei Ligationen von mehr als zwei verschiedenen DNAs wurden äquimolare Verhältnisse gewählt. Die Konzentration an Vektor-DNA betrug 20-40 pMol pro Ansatz.

Mußte das zu klonierende Fragment von anderen bei der Spaltung entstandenen Fragmenten isoliert werden, so wurde es in einem LMP-Agarosegel aufgetrennt und äußerst knapp daraus herausgeschnitten. Danach wurde es 5 Min bei 65 °C aufgeschmolzen und mit dem 2-fachen Volumen H₂O verdünnt.

Das Zusammenpipettieren von Proben mit LMP-Agarose geschah bis zur Enzymzugabe bei 37 °C im Heizblock, um das Gelieren zu vermeiden. D.h. die Reaktionsgefäße und das zum Volumen Auffüllen verwendete H₂O waren auf diese Temperatur vorgewärmt. Der 10-fach konzentrierte Ligase Puffer (Endkonzentration: 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.01 M MgCl₂, 0.01 M DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP und 1 mg/ml BSA) und das Enzym wurden zum Schluß dazupipettiert.

Proben, die keine LMP-Agarose enthielten wurden im Eisbad zusammenpipettiert.

Das Startvolumen wurde stets so klein wie möglich, aber nicht kleiner als 10 µl gehalten. Nach Zugabe von 0.5 µl T4 Ligase (=200U) pro 10 µl Reaktionsvolumen wurde für 30 Min bei RT inkubiert, danach wurde das Volumen auf 40 µl mit 1 x Ligasepuffer erhöht, 1.5 µl Ligase dazugegeben und entweder 2 Std bei RT oder über Nacht bei 12 °C inkubiert, wobei Ansätze mit mehr als zwei Fragmenten oder Ligationen glatter Enden immer über Nacht inkubiert wurden. Sollte ein lineares Molekül rezirkularisiert werden, so wurde eine geringe DNA-Konzentration in großem Volumen (10 pMol DNA in 40 µl) für die Reaktion gewählt. Von den Ligationsansätzen wurden 10-15 µl pro Transformation eingesetzt, der Rest bei -20 °C aufgehoben.

7.25. Transformation von *E. coli* K12-Stämmen (nach Hanahan, 1983)

Mit einer 10 ml Übernacht-Kultur in NZ-Medium - angeimpft mit einer Einzelkolonie des gewünschten Stammes - wurde eine neue Kultur 1:50 inokuliert und bis zu einer OD₆₀₀ von 0.5 bei 37 °C und 180 UpM inkubiert.

30 ml dieser Zellen wurden 10 Min bei 3 800 UpM und 4 °C in einem Corex-Röhrchen im HB4-Rotor pelletiert.

Das Pellet wurde rasch durch Schütteln in 10 ml TF-Puffer (10 mM K-MES pH 6.2, 100 mM RbCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM Hexaminkobaltchlorid) suspendiert und 10 Min auf Eis gestellt.

Danach wurde wie oben zentrifugiert, das Pellet in 1.5 ml TF-puffer durch vorsichtiges Pipettieren und Schwenken im Eis gelöst.

Von dieser Bakteriensuspension wurden pro Transformationsansatz 200 µl in vorgekühlte Eppendorfreaktionsgefäße aliquotiert, mit je 7 µl DMSO vermischt und 5 Min auf Eis stehen gelassen.

Nach Zugabe von 7 µl DTT-Lösung (2.25 mM DTT in 40 mM K-Acetat pH 6.0) und Mischen, wurden die Zellen für 10 Min auf Eis gestellt. Danach wurden nochmals 7 µl DMSO dazugemischt und wieder für 5 Min auf Eis inkubiert.

Nun wurde die zu transformierende DNA in einem Volumen kleiner als 15 µl hinzupipettiert, vorsichtig gemischt und für 30 Min auf Eis stehen gelassen.

In einem 42 °C Wasserbad wurden dann die Zellen für 90 Sek einem "Hitzeschock" ausgesetzt. Anschließend erfolgte eine Erholungsphase mit 800 µl LB-Medium bei 37 °C und 120 UpM für eine halbe Stunde.

Für den Fall, daß mit X-Gal-Platten auf weiße bzw. blaue Kolonien selektioniert werden sollte, mußte der Erholungsansatz außerdem eine Isopropylthiogalactosid-Konzentration von 1 mM enthalten.

Von jedem Ansatz wurden jeweils 1/9 und 9/9 auf die entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Bei Verwendung des X-Gal-Systems wurden vorher 100 µl der 1%igen X-Gal-Lösung (in Dimethylformamid) auf den Platten ausplattiert.

Sollten die Zellen bei -70 °C eingefroren werden, wurde statt TF-Puffer FS-Puffer (10 mM K-Acetat, 100 mM KCl, 45 mM MnCl₂, 10 mM CaCl₂, 3 mM Hexaminkobaltchlorid, 10% Glycerin, pH 6.4 / HCl) und keine DTT-Lösung zugesetzt.

7.26. Transformation von Hefezellen (nach Ito et al., 1983)

50 ml der bei 30 °C und 200 UpM bis zur OD₆₀₀=1.0 gewachsenen Hefekultur wurde in einem Falconröhrchen 8 Min bei 2 000 UpM und RT zentrifugiert (Minifuge GL). Das Zellpellet wurde in 5 ml 0.1 M Lithiumacetat suspendiert und nochmals unter den gleichen Bedingungen zentrifugiert. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt, die Zellen diesmal jedoch in 2.5 ml 0.1 M Lithiumacetat aufgenommen. Die Zellsuspension wurde dann 30 Min bei 120 UpM und 30 °C inkubiert, um danach unter den Bedingungen wie oben

pelletiert und in 0.3 ml 0.1 M Lithiumacetat suspendiert zu werden. Pro Transformationsansatz wurden 1-5 µg der zu transformierenden DNA in einem Volumen von 20 µl oder weniger zu 100 µl der kompetenten Zellen gegeben und vorsichtig gemischt. Der Ansatz wurde 30 Min bei 120 UpM und 30 °C inkubiert. Nach Unterschichten mit 600 µl PEG-Lösung (40% PEG 4000 in H₂O, sterilfiltriert) und vorsichtigem Mischen wurde 60 Min bei 120 UpM und 30 °C inkubiert.

Es wurden je 10% und 90% des Transformationsansatzes vorsichtig mit 5 ml flüssigem, 42 °C warmen Top-Agar (0.3% Agar im Selektionsmedium und 1 M Sorbitol) gemischt, auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und bei 30 °C für 2-3 Tage inkubiert.

7.27. Herstellung von ExoIII - Exo VII - Deletionsmutanten (nach Yanisch Perron et al., 1985)

Die Methode eignet sich für die Herstellung von Deletionsmutanten verschiedener Länge, um diese dann mit Universalprimern zu sequenzieren. Deletiert werden können in Multi-copyvektoren klonierte DNA-Fragmente, wenn vor der Insertion geeignete Restriktionsschnittstellen vorhanden sind.

Das Prinzip der Methode beruht auf den Spezifitäten der beiden verwendeten Exonukleasen: Exonuklease III erkennt 5'-überhängende DNA-Enden und degradiert den 3'-Strang, wobei 3'-überhängende oder glatte DNA-Enden vor Abbau geschützt sind. Exonuklease VII ist einzelstrangspezifisch und baut den freigesetzten Einzelstrang ab. Voraussetzung für die Anwendung sind daher zwei geeignete jeweils auf einer Seite der Insertion gelegene Restriktionsschnittstellen. Nach Spaltung des entsprechenden Plasmids und den Reaktionen mit beiden Exonukleasen werden evtl. noch vorhandene 5'-überhängende DNA-Enden mit Klenow-Polymerase aufgefüllt, mit T4-Ligase ligiert und anschließend transformiert. Um eine genügende Vielzahl verschiedener Deletionen zu generieren, wird eine Zeitkinetik für die Exonuklease III - Reaktion durchgeführt. Idealerweise sollten Klone erzeugt und ausgewählt werden, die Deletionen von 200 bp und einem mehrfachen davon aufweisen, um bei der Sequenzanalyse überlappende Sequenzbereiche zu erhalten.

EXO III-PUFFER (einfach):

50 mM Tris-HCl pH 8.0

5 mM MgCl₂

1 mM DTT

EXO VII-PUFFER (10-fach):

500 mM Kaliumphosphat pH 7.0

80 mM EDTA pH 7.0

10 mM DTT

10 µg des Plasmids, in dessen Insertion verschieden lange Deletionen eingeführt werden sollten, wurde mit zwei Restriktionsenzymen geschnitten. Dabei wurden Restriktionsenzyme gewählt, die an dem Ende der Insertion, an dem die Deletion gesetzt werden sollte ein 5'-Überhang und am zu schützenden Ende ein 3'-Überhang erzeugten. Nach dem Restriktionsverdau (Volumen: 100 µl) wurden 12 µl 80 mM EDTA, 40 µl 5 M NH₄Ac (spH 5.5) und 300 µl Isopropanol dazugegeben, geschüttelt und 15 Min bei RT stehen gelassen. Das dadurch erhaltene DNA-Präzipitat wurde 5 Min bei 13 000 UpM und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Für die Exonuklease III-Reaktion wurde es in 160 µl Exo III-Puffer gelöst. Die Exonuklease III wurde im Exo III-Puffer auf 4 U/µl verdünnt. Zu 40 µl der DNA wurden 2 µl Exonuklease III (=8 U) pipettiert. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C, wobei jede Minute 2 µl abgenommen und in ein 2 µl 10 x Exo VII-Puffer enthaltendes Eppendorfreaktionsgefäß gegeben wurde. Nach 10 Min wurden die Aliquots in ein zweites Eppendorfreaktionsgefäß, das ebenfalls 2 µl 10 x Exo VII-Puffer enthielt, pipettiert. Dadurch wurden die Reaktionsprodukte der ersten 10 Min und der folgenden 10 Min gesammelt, wodurch Gemische verschiedener kürzerer bzw. längerer Deletionen vereinigt wurden. Anschließend wurde jeder der Ansätze mit 1 µl Exonuklease VII (10 U/µl) für 45 Min bei 37 °C inkubiert, danach die Reaktion durch 15 minütige Inkubation bei 70 °C gestoppt. Vor der Klenow-Auffüllreaktion wurde zu den Ansätzen je 1.5 µl 200 mM MgCl₂ und 1 µl dNTP-Lösung (8 mM dNTP) gegeben. Die Reaktion wurde für 30 Min mit 0.5U Klenow-Enzym bei RT durchgeführt. Die beiden sich anschließenden Ligationsansätze setzten sich aus folgenden Teilen zusammen: 5 µl der Produkte der kürzeren (10 Min) bzw. der längeren (20 Min) Reaktionszeit, 5 µl 10 x Ligase-Puffer (Endkonzentration: 0.05 M Tris-HCl pH 7.5, 0.01 M MgCl₂, 0.01 M DTT, 1 mM Spermidin, 1 mM ATP und 1 mg/ml BSA), 40 µl H₂O und 1 µl Ligase. Es wurde bei 12 °C über Nacht ligiert, am nächsten Tag 10 µl Aliquots in kompetente *E. coli* JM109-Zellen transformiert und diese auf den entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert. Von den Transformanten wurden 96 DNA Mini-Plasmidisolierungen gemacht.

7.28. Präparation einzelsträngiger M13 Phagen - DNA (nach Messing, 1983, modifiziert)

1.6 ml einer JM109 Kultur in NZ-Medium mit einer OD₆₀₀ von 0.2-0.4 wurde mit 100 µl Phagen-Suspension (1 Plaque in 1 ml NZ-Medium suspendiert) infiziert und 5-12 Std bei 37 °C und 200 UpM inkubiert.

Nach zweimaligem Zentrifugieren von 1.5 ml dieser Kultur (10 Min, 13 000 UpM, 4 °C) wurde der Überstand (1.2 ml) mit 200 µl 20% (G/V) PEG 6000 in 2.5 M NaCl gut geschüttelt und 15 Min bei RT stehen gelassen. Danach wurde 15 Min bei 13 000 UpM und RT zentrifugiert, das Pellet nach Verwerfen des Überstandes in 90 µl TE und 10 µl 3 M NaAc (pH 5.0) gelöst. Danach erfolgte eine Phenolextraktion mit dem gleichen Volumen Chloroform. Nach einminütiger Zentrifugation wurde die obere Phase abgenommen, mit dem 2.5-fachen Volumen EtOH gemischt und die DNA für 15 Min bei -70 °C präzipitiert. Die nach 10 Min bei 13 000 UpM und 4 °C pelletierte DNA wurde mit 70%igem EtOH gewaschen und im Exsikkator getrocknet. Die so gewonnene Einzelstrang-DNA wurde in 50 ml TE gelöst und konnte so in der entsprechenden Menge für Mutageneseexperimente verwendet werden.

7.29. Gezielte Mutagenese mit Hilfe von Oligodeoxynukleotiden (nach Newman et al., 1985)

Das Prinzip der Methode beruht auf der *in vitro* Neusynthese von DNA mit der zu mutagenisierenden M13 Einzelstrang-DNA als Template, wobei das als Primer der Polymerasereaktion verwendete Oligodeoxynukleotid die entsprechend modifizierte Basenabfolge enthält. Dabei kann es sich sowohl um Deletion, Insertion als auch Austausch einer gewünschten Region bezüglich der Template-DNA handeln. Die bei der Reaktion entstandene Heterodoppelstrang-DNA wird in kompetente *E. coli*-Zellen transformiert und in mehreren Verdünnungsstufen so ausplattiert, daß sich 200-300 Plaques pro Petrischale (Ø=8 cm) bilden. Durch Plaque-Hybridisierung (siehe E 7.30.) können sodann mit dem radioaktiv markierten Mutagenese-Oligodeoxynukleotid positive Phagen identifiziert werden, die mit großer Wahrscheinlichkeit die gewünschte Mutation enthalten.

Phosphorylieren des Mutagenese-Oligodeoxynukleotids:

Zunächst wurden in einem Volumen von 20 µl 10 pmol Mutagenese-Oligodeoxynukleotid mit 100 µCi γ -³²P]-ATP in 70 mM Tris-HCl (pH 7.6), 10 mM MgCl₂, 5 mM DTT und 4U

T4 Polynukleotidkinase für 60 Min bei 37 °C phosphoryliert. Die Reaktion wurde durch Inkubation für 10 Min bei 70 °C gestoppt. Nach Zugabe von 1 µg *E. coli* Carrier-tRNA, 2 µl 3 M NaAc (pH 5.0) und 2.5 Volumen EtOH wurde für 10 Min bei -70 °C gefällt. Nach Zentrifugation für 10 Min bei 13 000 UpM und 4 °C wurde der Überstand verworfen, das Pellet in 1 ml 0.2 M NTE gelöst und durch Ionenaustauschchromatographie über eine DEAE-Säule wie in E 7.9. gereinigt.

Die probenenthaltende Fraktion mit den höchsten cpm-Werten wurde nach Zugabe von 2 µl Glycogen, 0.1 Volumen 3 M NaAc (pH 5.0), 2.5 Volumen EtOH 10 Min bei -70 °C gefällt. Das nach dem Zentrifugieren entstandene Pellet wurde mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen und nach Trocknen im Exsikkator in 20 µl TE aufgenommen.

DNA-Synthese:

Es wurden immer drei Reaktionen angesetzt, um die Synthese des zweiten Stranges bei drei verschiedenen Temperaturen durchführen zu können. Die Ansätze enthielten jeweils 1 pmol der zu mutagenisierenden M13 Einzelstrang-DNA, 10 pmol phosphoryliertes Oligodeoxynukleotid, 3 µl 5 x Klenow-Puffer (500 mM HEPES pH 7.5, 33 mM MgCl₂, 250 mM NaCl, 5 mM β-Mercaptoethanol) und H₂O bis zu einem Volumen von 12 µl. Nach Erwärmen der Probe für 1 Min bei 80 °C wurde innerhalb 15 Min auf RT abgekühlt danach 3 µl dNTP-Lösung (2.5 mM von jedem dNTP, 20 mM DTT) und 4U Klenow-Polymerase dazugegeben. Inkubiert wurden die drei Ansätze bei 15 °C, 22 °C und 37 °C. Nun wurden jeweils 1 µl 20 mM ATP, 10U T4 Ligase dazugegeben und 2 Std bei 15 °C ligiert.

Mit 2 µl dieser Reaktion wurden 200 µl kompetente *E. coli* JM109-Zellen transformiert, von welchen nach dem Hitzeschock 2 µl, 20 µl und 180 µl mit 150 µl einer *E. coli* JM109-Kultur (OD₆₀₀: 0.2-0.3, in NZ-Medium) gemischt wurden. Diese Verdünnungen wurden jeweils in 3 ml 42 °C warmen H-Top Agar pipettiert, geschüttelt, gleichmäßig auf eine NZ-Agarplatte gegossen und 12-16 Std bei 37 °C inkubiert.

7.30. Plaquehybridisierung (nach Maniatis et al., 1982)

Zur Identifizierung positiver rekombinanter M13 Phagen, wurden NC-Filter für 2 Min bei RT auf die wie im vorangegangenen Kapitel erzeugten Plaques gelegt und so markiert, daß Orte auf Filter und Agarplatte eindeutig zugeordnet werden können. Um im Autoradiogramm Artefaktsignale von Hybridisierungssignalen unterscheiden zu können, wurden Doppelfilter angelegt. Der zweite Filter wurde doppelt so lange wie der erste Filter aufgelegt.

Zum Denaturieren wurden die Filter mit der zuvor mit dem Agar in Kontakt gewesenen Seite nach oben 4 Min auf ein mit 0.5 M NaOH, 1.5 M NaCl getränktes Whatman 3MM™-Papier gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, daß keine Flüssigkeit auf die Oberseite der Filter gelangte. Danach wurden die Filter zum Entfernen überschüssiger Denaturierungslösung kurz auf ein trockenes Whatman 3MM™-Papier gelegt, bevor sie auf einem mit 1 M Tris-HCl (pH 7.0), 1.5 M NaCl getränktem Whatman 3MM™-Papier 2-4 Min neutralisiert wurden. Anschließend wurden die Filter 20-30 Sek in 3 x SSC geschwenkt und auf trockenes Whatman 3MM™-Papier gelegt, um sie dann für 1-2 Std im Vakuum bei 80 °C zu backen. Wahlweise wurden die noch feuchten Filter mit der UV-Handlampe 2 Min aus 7.5 cm Abstand bestrahlt. Die Filter konnten nun - trocken oder feucht - für Hybridisierungen eingesetzt werden.

7.31. Sequenzierung doppelsträngiger Plasmid DNA (nach Sanger et al., 1977; modifiziert nach Chen und Seeburg, 1985)

0.5 pmol Plasmid DNA wurden nach Trocknen im Exsikkator 5-10 Min in 40 µl Denaturierungspuffer (0.2 M NaOH, 0.2 mM EDTA) bei RT im Eppendorfschüttler denaturiert. Die Präzipitation der DNA erfolgte nach Zugabe von 1/10 Vol. 2 M Ammoniumacetat (pH 4.5) und 2 Vol. EtOH für 5 Min bei -70 °C. Die anschließende Zentrifugation wurde für 10 Min, 4 °C und 13 000 UpM durchgeführt. Das Pellet wurde vor dem Trocknen im Vakuum mit 1 ml 70%igem EtOH gewaschen.

Das molare Verhältnis von Template zu Primer betrug zwischen 1 : 5 bis 1 : 10. Die Hybridisierungsreaktion enthielt 2.5-5 pmol Oligonukleotid, 7 mM Tris-HCl (pH 7.5), 7 mM MgCl₂, 50 mM NaCl, 15 mM DTT, 16 µCi α [³⁵S]-dATP (8 mCi/ml, 650 Ci/mmol), 0.5 pmol DNA-Pellet und H₂O bis zu einem Gesamtvolumen von 15 µl. Der Ansatz wurde für 15 Min bei 37 °C inkubiert. Danach wurde 1 µl (2 U/µl.) Klenow-Polymerase dazupipettiert.

Jeweils 3 µl aus obigem Ansatz und 2 µl der entsprechenden Kettenabbruch-Mixe wurden gemischt und für 20 Min bei 30 °C inkubiert. Die Kettenabbruch-Mixe sind folgendermaßen zusammengesetzt (Lösungen in 1xReaktionspuffer):

	A-Mix	T-Mix	G-Mix	C-Mix
dTTP	100 mM	5 mM	100 mM	100 mM
dGTP	100 mM	100 mM	5 mM	100 mM
dCTP	100 mM	100 mM	100 mM	10 mM
ddATP	100 mM	-	-	-
ddTTP	-	500 mM	-	-
ddGTP	-	-	120 mM	-
ddCTP	-	-	-	100 mM

Danach wurden je 1.5 µl "Chase"-Lösung (0.125 mM von jedem dNTP) dazugegeben und für 15 Min bei 30 °C weiterinkubiert.

Zu jeder Probe wurden 4 µl Formamidauftragspuffer pipettiert. Vor dem Auftragen auf das Sequenzgel wurden die Proben 3 Min gekocht.

Pro Elektrophorese wurde die Hälfte jeder Probe verwendet. Die andere Hälfte wurde meistens zeitversetzt (Details im nächsten Kapitel) aufgetragen oder bis zum Vorliegen des Autoradiogramms bei -20 °C aufgehoben.

7.32. Sequenzgel-Elektrophorese

Die Glasplatten hatten eine Dimension von 40x22x0.5 cm. Sie wurden vor dem Zusammenbau oberflächenbehandelt. Eine der Platten wurde silikonisiert: Nach sorgfältiger Reinigung wurde sie mit 5 ml einer Lösung bestehend aus 5% Dimethyldichlorsilan in Chloroform (V/V) eingerieben (im Abzug!) und anschließend mit 70%igem EtOH gespült und poliert. Die Gegenplatte wurde - ebenfalls nach sorgfältiger Reinigung - mit Bindsilan behandelt: Sie wurde mit einer Lösung bestehend aus 17.5 µl Bindsilan (γ-Methacryloxypropyl-Trimethylsilan), 175 µl 10%iger Essigsäure in 6.5 ml EtOH eingerieben und anschließend ebenfalls mit 70%igem EtOH gespült und poliert. Dies bewirkt eine kovalente Bindung des Gels mit der Platte. Die Spacer war 0.2 mm dick. Der Geltaschenformer hatte 4x8 mm große Zähne getrennt durch 2 mm breite Stege.

Die Acrylamidkonzentration (Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid, 19 : 1) betrug 6% in 7 M Harnstoff und 1 x TBE Laufpuffer. Unmittelbar vor dem Gießen des Gels wurden zu 50 ml dieser Lösung 250 µl einer 10%igen, frisch angesetzten Ammoniumperoxodisulphat Lösung (in H₂O) und 50 µl TEMED dazupipettiert.

Nach mindestens einstündiger Polymerisation konnte das Gel benutzt werden. Um eine gleichmäßige Wärmeverteilung während des Laufs zu gewährleisten, wurde eine 6 mm dicke Aluminiumplatte an eine der Glasplatten geklammert. Vor dem Auftragen der Proben wurde

stets ein 15 minütiger Vorlauf gemacht, um das Gel zu erwärmen. Idealerweise wird die Elektrophorese bei einer Temperatur von 45-65 °C durchgeführt.

Die Stromversorgung wurde auf 40 Watt konstante Leistung eingestellt (dabei ergibt sich unter den beschriebenen Bedingungen eine Spannung zwischen 2 000 und 2 700 Volt).

Bei zeitversetzter Elektrophorese der Reaktionen wurde die zweite Hälfte der Probe erst aufgetragen nachdem das Xylencyanol an die untere Kante des Gels gewandert war.

Wenn das Bromphenolblau die gesamte Gellänge zurückgelegt hatte, wurden die Glasplatten voneinander getrennt. Das Gel wurde 15 Min in 10%iger Essigsäure fixiert, kurz gewässert, mit einem Heißluftföhn getrocknet und bei -70 °C autoradiographiert.

8. PROTEINEXPRESSION UND ANALYSE

8.1. Induktion des *GALI-10* Promotors

Da der *GALI-10* Promotor in Gegenwart von Galaktose dereprimiert wird, wurde für dessen Induktion das Medium von Glukose auf Galaktose als einzige C-Quelle umgestellt. Der Reinheitsgrad der Galaktose war dabei von besonderer Bedeutung, da schon geringe Spuren von Glukose oder anderen Zuckern den Promotor reprimieren (Adams, 1972).

Zunächst wurden 50 ml Kulturen der betreffenden *S. cerevisiae* Stämme in Minimalmedium mit Glukose 2 Tage bei 30 °C und 200 UpM inkubiert. Vor dem Abzentrifugieren der Zellen für 7 Min bei 2 000 UpM und RT (Minifuge GL), wurde deren OD₆₀₀ gemessen. Danach wurden sie in Minimalmedium mit Galaktose auf eine OD₆₀₀ von 0.5 eingestellt. Die Zellen wurden für 12-16 Std wie zuvor weiterinkubiert. Danach wurde erneut die OD₆₀₀ bestimmt, abzentrifugiert und die Zellen in Minimalmedium mit Galaktose suspendiert, sodaß sich eine Zelldichte von OD₆₀₀ = 0.3 ergab. Nach 3 - 4 Std Wachstum und einer OD₆₀₀ zwischen 0.4 und 0.8 wurden die Zellen und das Medium zur Protein-, DNA- oder RNA-Isolierung aufgearbeitet.

8.2. Aufschluß von Hefezellen mit der French-Press

Der Aufschluß der Zellen wird bei dieser Methode durch Druckentspannung bewirkt. Zunächst wird die Probe in einen Stahlzylinder gefüllt, wo sie hydraulisch mit einem Stempel

unter Druck gesetzt wird. Nachdem der Druck aufgebaut ist wird die Probe durch langsames Öffnen des Auslaßventils abgelassen, wobei die Zellen platzen.

Die Zellen einer 100 ml Kultur ($OD_{600} = 0.5$) wurden für 10 Min bei 6 000 UpM (Minifuge GL) und 4 °C in 50 ml Falconröhrchen pelletiert. Der Überstand wurde für die weitere Verarbeitung auf Eis gestellt, das Pellet in 2 ml PBS/PMSF suspendiert und in den bei 4 °C vorgekühlten 6 ml fassenden Stahlzylinder der French-Press gefüllt. Die Zellen wurden im Kühlraum bei 1 000 psi (Pound per square inch) aufgeschlossen. Der Aufschluß wurde für 15 Min bei 4 °C und 13 000 UpM (Sigma 2MK) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 0.5 ml PBS/PMSF suspendiert, der Überstand direkt für die Analysen eingesetzt.

8.3. Aufschluß von Hefezellen mit dem Bead-Beater

Das Prinzip der Methode beruht auf der mechanischen Zertrümmerung der Hefezellen in Gegenwart von Glasperlen. Das Gerät ist im wesentlichen wie ein Küchenmixer konstruiert, mit dem Unterschied, daß statt dem Messer ein stumpfer Teflonflügel rotiert und die Reaktionskammer gekühlt werden kann.

Die Zellen einer 100 ml Kultur ($OD_{600} = 0.5$) wurden für 10 Min bei 6 000 UpM (Minifuge GL) und 4 °C in 50 ml Falconröhrchen pelletiert. Das Pellet wurde in 30 ml PBS/PMSF suspendiert und in die mit Glasperlen (Durchmesser 0.5 mm) zur Hälfte gefüllte 90 ml fassende Reaktionskammer des Geräts gefüllt. Es wurde dreimal eine Minute gemixt, dazwischen zur Kühlung der Proben ebensolange Pausen eingelegt. Der Aufschluß wurde durch vorsichtiges Abgießen ohne Glasperlen in ein Falconröhrchen überführt. Die Glasperlen wurden zweimal mit 10 ml PBS/PMSF nachgespült. Die Spüllösung wurde ebenfalls in das Falconröhrchen überführt. Die Probe wurde für 15 Min bei 4 °C mit 6 000 UpM (Minifuge GL) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml PBS/PMSF suspendiert, der Überstand mit dem vierfachen Volumen Methanol gemischt, um die in Lösung befindlichen Proteine zu präzipitieren (Details siehe nächstes Kapitel).

8.4. Proteinisolierung aus Hefezellkulturüberständen

Die vor dem French-Press bzw. Bead-Beater Zellaufschluß aufbewahrten Zellkulturüberstände wurden erneut für 10 Min bei 6 000 UpM zentrifugiert. 50 ml davon wurden mit

vierfachem Volumen Methanol 20 Min bei RT inkubiert, und währenddessen leicht bewegt. Die ausgefällten Proteine wurden durch Zentrifugieren für 20 Min bei 6 000 UpM pelletiert. Der Überstand bei -20 °C aufbewahrt, das Pellet 5 Min im Exsikkator angetrocknet, in 10 ml PBS/PMSF suspendiert und nochmals in der gleichen Weise wie oben behandelt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Pellet in 300 µl PBS/PMSF suspendiert und bis zur weiteren Verwendung ebenfalls bei -20 °C gelagert.

8.5. Proteinnengenbestimmung

Die Proteinkonzentrationen der Proben wurden mit dem Bio-Rad Protein Assay bestimmt, der nach Angaben des Herstellers durchgeführt wurde.

8.6. SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese von Proteinen (nach Fling und Gregerson, 1986)

Zunächst wurden die Glasplatten (20 x 20 cm) und Spacer (1.5 mm) aufeinandergeklammert und mit 1%iger Agarose in H₂O abgedichtet. Nach Erstarren der Agarose wurde das Trenngel (50 ml: 13% PAA - Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid = 37 : 1 - in 750 mM Tris-HCl pH 8.85, 0.1% SDS, 200 µl 10% APS, 10 µl TEMED) in die vertikal stehenden Platten bis auf eine Höhe von 10 cm aufgefüllt und mit n-Butanol überschichtet.

Nach 20 Min wurde das n-Butanol mit Filterpapier abgenommen, das Sammelgel (10 ml: 3% PAA - Acrylamid : N,N'-Methylenbisacrylamid = 37 : 1 - in 125 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.1% SDS, 60 µl 10% APS, 10 µl TEMED) gegossen und der Geltaschenformer eingesetzt. Er hatte je nach Bedarf 12 oder 15 Taschen.

Nach der Polymerisation wurde der Kamm entfernt, das Gel in die Apparatur eingebaut und der Laufpuffer (50 mM Tris, 190 mM Glycin, 0.1% SDS, pH ist dadurch auf 8.5 eingestellt) in die Pufferreservoirs gefüllt, womit das Gel für das Auftragen der Proben fertiggestellt war. Die Proben wurden vor dem Auftragen 1 : 1 mit dem gleichen Volumen Auftragspuffer (10% Glycerin, 15% β-Mercaptoethanol, 3% SDS, 62.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.01% Bromphenolblau) gemischt und 5 Min gekocht.

Die Elektrophorese erfolgte wahlweise bei 300 V für 3.5 Std, 250 V für 5 Std oder 70 V für 16 Std, wobei bei 300 V und 250 V wegen der Wärmeentwicklung und deren gleichmäßiger Verteilung eine Aluminiumplatte an das Gel geklammert wurde.

8.7. Western-Blot (nach Kyhse-Andersen, 1984)

Die Methode ist für den schnellen Transfer von Proteinen aus PAA-Gelen (auch mehrere übereinander) auf NC-Filter geeignet.

Der Aufbau der Apparatur erfolgte nach folgendem Schema: Auf die untere Graphitplatte (Kathode) wurden 10 Blatt Whatman 3MM™ Papiere, die mit Puffer I (40 mM 6-Aminohexansäure, 25 mM Tris-HCl pH 10.4, 20% (V/V) Propanol) getränkt waren, gelegt. Darauf folgte das SDS-Polyacrylamidgel und der in Puffer III (25 mM Tris-HCl pH 10.4, 20% (V/V) Propanol) getränkte NC-Filter (Satorius), wobei der Einschluß von Luftblasen vermieden wurde. Danach wurden 2x6 Lagen Whatman 3MM™ Papiere aufgelegt, wovon die ersten 6 mit Puffer III der Rest mit Puffer II (300 mM Tris-HCl pH 10.4, 20% (V/V) Propanol) getränkt waren. Zuletzt wurde die obere Graphitplatte (Anode) leicht auf den Aufbau gepreßt.

Der Transfer wurde für 1-2 Std, 0.9 mA/cm² oder 12-16 Std, 0.2 mA/cm² bei 4 °C durchgeführt. Danach wurde der NC-Filter ohne weitere Behandlung und feucht für die Immunreaktion eingesetzt.

8.8. Ponceaufärbung von auf NC-Filter geblotteten Proteinen

Nach Western-Blotting konnten die auf den NC-Filter übertragenen Proteine mit Ponceau S Lösung (0.2% (G/V) in 3% TCA) angefärbt werden. Dies geschah unter leichter Bewegung für 15 Min bei RT, wobei der Filter von der Färbelösung bedeckt war. Die Entfärbung erfolgte mit deionisiertem H₂O, das öfters ausgetauscht wurde. Dabei mußte darauf geachtet werden, daß der Filter nicht zu sehr entfärbt wurde. Das rote Proteinmuster wurde mit Grünfilter Blende 8 und 1/125 Sek Belichtungszeit (Werte für 27 DIN Filmempfindlichkeit) fotografiert.

8.9. Coomassiefärbung von Proteingelen

Bei Bedarf wurden SDS-Polyacrylamidgele 45 Min in Coomassie Färbelösung (25% TCA, 1.5 g/l Coomassie brilliant blue in H₂O) bei leichter Bewegung und RT angefärbt. Entfärbt wurde unter den gleichen Bedingungen für mindestens 2 Std in 7%iger Essigsäurelösung, die

zweimal ausgetauscht wurde. Zur Adsorption der Farbe aus der Entfärbelösung wurde ein ca. 3 x 3 x 15 cm großer Schaumgummi in diese gelegt. Fotografiert wurden die Gele mit Gelbfilter bei Blende 8 und 1/60 Sek (Werte für 27 DIN Filmempfindlichkeit).

8.10. Immunreaktion

Bei der beschriebenen Methode handelt es sich um den indirekten Nachweis von auf Nitrocellulose gebundenen Proteinen. Der dabei entstehende Aufbau wird auch als "Sandwich" bezeichnet:

Nitrocellulose - Filter

Protein (Antigen)

Erster Antikörper

Zweiter Antikörper, mit alkalischer Phosphatase konjugiert

Substrat

Reagiert der erste Antikörper mit der für ihn spezifischen, am NC-Filter gebundenen Antigenstruktur, so kann dieser wiederum von dem zweiten Antikörper gebunden werden. Als Nachweis des zweiten Antikörpers wird ein zunächst farbloses Substrat (5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat) zugesetzt, das bei Anwesenheit der mit dem zweiten Antikörper konjugierten alkalischen Phosphatase dephosphoryliert und durch Luftsauerstoff oxidiert wird. Dadurch entsteht ein blauer, gut erkennbarer Farbstoff.

Der NC-Filter wurde mit 20% NBCS-TBS (20% New born calf serum in TBS, alle Volumina betragen 1 ml/3 cm² Filter) für 1 Std, RT und leichtem Schwenken vorinkubiert. Danach wurde er in 20% NBCS-TBS und dem Kaninchen-anti-Maus-Immunglobulin G-Serum (Dakopatts) in einer Verdünnung von 1 : 5 000 für 1.5 Std (oder ÜN) unter den gleichen Bedingungen behandelt. Das Waschen erfolgte durch einminütiges Schwenken in TBS, wobei das TBS dreimal ausgetauscht wurde. Anschließend wurde einmal für 5 Min mit NP40/TBS und erneut dreimal mit TBS gewaschen. Als zweiten, mit alkalischer Phosphatase konjugierten Antikörper, wurde ein Ziege-anti-Kaninchen-Serum verwendet. Mit einer 1 : 7 500 in 20% NBCS-TBS Verdünnung dieses Serums wurde der Filter eine Std bei RT geschwenkt. Danach wurde unter identischen Bedingungen wie oben gewaschen . Für die Farbreaktion wurde der Filter in Substratlösung geschwenkt (jedesmal frisch angesetzt).

Substratlösung:

25	µl	NBT* (75 mg/ml Nitroblue Tetrazolium in 70% Dimethylformamid)
150	µl	BCIP* (50 mg/ml 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl-Phosphat in 100% Dimethylformamid)
50	ml	Substratpuffer (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 8.8, 5 mM MgCl ₂)

* Lösungen wurden bei 4 °C und Dunkelheit aufgehoben.

Die Farbentwicklung wurde abhängig vom Grad der Intensität nach 10-40 Min durch Waschen mit deionisiertem H₂O gestoppt, der NC-Filter getrocknet und mit 1/125 Sek, Blende 8 (27 DIN Filmempfindlichkeit) fotografiert.

1. ÜBERSICHT ALLER IN DIESER ARBEIT VERWENDETEN PLASMIDE

BEZEICHNUNG DES PLASMIDS	BESCHREIBUNG DER WICHTIGSTEN EIGENSCHAFTEN	GRÖSSE IN kb	LITERATUR bzw. HERKUNFT
VEKTOREN:			
pBR322	Tc ^r , Ap ^r , <i>ORI</i> ;	4.36 kb	Sutcliffe, 1979
pUC13, 18, 19	Ap ^r , <i>ORI</i> , Polylinker, <i>lacZ</i> , <i>lac i</i> ;	2.72 kb	Yanish-Perron, 1985
M13mp19	<i>lacZ</i> , <i>lac i</i> , <i>ORI</i> , Polylinker;	7.25 kb	Yanish-Perron, 1985
pEMBLyc31	<i>LEU2</i> , Ap ^r , <i>ORI</i> , 2 μ , <i>fl</i> , <i>lacZ</i> , <i>lac i</i> , Polylinker;	8.10 kb	G. Cesareni EMBL, Heidelberg
pEMBLyc23	<i>URA3</i> , Ap ^r , <i>ORI</i> , 2 μ , <i>fl</i> , <i>lacZ</i> , <i>lac i</i> , Polylinker;	7.38 kb	G. Cesareni EMBL, Heidelberg

REKOMBINANTE PLASMIDE:

pGALCEN3-	<i>URA3</i> , Ap ^r , <i>CEN4</i> , <i>CEN3</i> , <i>ARSI</i> , <i>GAL1-10</i> , in YCp50;	6.74 kb	Chris Greer, Irvine
pg355	Actin-Terminator, SP6-, SP7-Promotor, Ap ^r , in pGEM-2 (Promega Biotec);	3.25 kb	Karin Vogel, Martinsried
pAAH5	<i>ADCI</i> -Terminator, <i>ADCI</i> -Promotor <i>LEU2</i> , 2 μ , Ap ^r ;	11.95 kb	S. Thompson-Jäger Martinsried
pBRL 2, 11, 12, 13	pBR322, Tc ^r , leichte Kette, unter- schiedliche Orientierungen;	5.36 kb	diese Arbeit
pBRS 1, 7, 17	pBR322, Tc ^r , schwere Kette, unter- schiedliche Orientierungen;	6.01 kb	diese Arbeit
pUC13L 5, 7	pUC13, Ap ^r , leichte Kette, unter- schiedliche Orientierungen;	3.72 kb	diese Arbeit
pUC13E7L	pUC13, Ap ^r , ExoIII-VII-Deletion # 7 leichte Kette;	3.29 kb	diese Arbeit
pUC13E11L	pUC13, Ap ^r , ExoIII-VII-Deletion # 11 leichte Kette;	3.61 kb	diese Arbeit
pUC13E12L	pUC13, Ap ^r , ExoIII-VII-Deletion # 12 leichte Kette;	3.40 kb	diese Arbeit
pUC13E14L	pUC13, Ap ^r , ExoIII-VII-Deletion # 14 leichte Kette;	3.08 kb	diese Arbeit

BEZEICHNUNG DES PLASMIDS	BESCHREIBUNG DER WICHTIGSTEN EIGENSCHAFTEN	GRÖSSE IN kb	LITERATUR bzw. HERKUNFT
pUC13E21L	pUC13, Ap ^r , ExoIII-VII-Deletion # <u>21</u> leichte Kette;	3.15 kb	diese Arbeit
pUC13E36L	pUC13, Ap ^r , ExoIII-VII-Deletion # <u>36</u> leichte Kette;	3.49 kb	diese Arbeit
pUC18XK	pUC13, Ap ^r , XhoI-KpnI-Fragment aus pM;	4.15 kb	diese Arbeit
pUC13LG	pUC13, Ap ^r , leichte Kette, <i>GAL1-10</i> Promotor;	4.32 kb	diese Arbeit
pBRS1mp18	pBR322, Tc ^r , schwere Kette, <u>mp18</u> Polylinker;	6.61 kb	diese Arbeit
pBRSGL	pBR322, Tc ^r , schwere Kette, <i>GAL1-10</i> Promotor, leichte Kette, mp18 Polylinker;	8.50 kb	diese Arbeit
M13mp19SGL	M13mp19, schwere Kette, Teil v. pBR322, <i>GAL1-10</i> Promotor, leichte Kette, vor Mutagenese;	9.60 kb	diese Arbeit
M13mp19SGLm	M13mp19, Teil A der schweren Kette, <i>GAL1-10</i> Promotor, Teil A der leichten Kette, nach Mutagenese;	8.87 kb	diese Arbeit
pUC18TS	pUC18, Actin Terminator, Teil B der schweren Kette;	3.90 kb	diese Arbeit
pUC18TL	pUC18, <i>ADH1</i> Terminator, Teil B der leichten Kette;	3.90 kb	diese Arbeit
pUC18TSGL	pUC18, Actin Terminator, Teil A der schweren Kette, <i>GAL1-10</i> Pro- motor, Teil A der leichten Kette;	5.40 kb	diese Arbeit
pM	pEMBL Ye23, Actin Terminator, schwere Kette, <i>GAL1-10</i> Promotor, leichte Kette, <i>ADH1</i> Terminator;	12.03 kb	diese Arbeit
M13mp19SKGLm	M13mp19, Teil A der schweren Kette mit Killer-Toxin Leadersequenz, <i>GAL1-10</i> Promotor, Teil A der leichten Kette, nach Mutagenese;	8.87 kb	diese Arbeit
pUC18TSKGL	pUC18, Actin Terminator, Teil A der schweren Kette mit Killer-Toxin Leader- sequenz, <i>GAL1-10</i> Promotor, Teil A der leichten Kette;	5.40 kb	diese Arbeit
pMK	M13mp19, Actin Terminator, schwere Kette, Killer-Toxin Signalsequenz, <i>GAL1-10</i> Promotor, leichte Kette, <i>ADH1</i> Terminator, pEMBL.Ye31;	11.29 kb	diese Arbeit
pUC13p7S	228 bp PstI-Fragment der schweren Kette, pUC13;	2.93 kb	diese Arbeit
pUC13p25S	257 bp PstI-Fragment der schweren Kette, pUC13;	2.96 kb	diese Arbeit
pUC13p13S	941 bp PstI-Fragment der schweren Kette, pUC13;	3.64 kb	diese Arbeit

BEZEICHNUNG DES PLASMIDS	BESCHREIBUNG DER WICHTIGSTEN EIGENSCHAFTEN	GRÖSSE IN kb	LITERATUR bzw. HERKUNFT
pUC18XS	467 bp <u>Xho</u> I- <u>Sac</u> I-Fragment der <u>s</u> chweren Kette, p <u>UC</u> 13;	3.17 kb	diese Arbeit
pUC18SS	312 bp <u>Sac</u> I- <u>Sac</u> I-Fragment der <u>s</u> chweren Kette, p <u>UC</u> 13;	3.01 kb	diese Arbeit

2. RESTRIKTIONSKARTEN

Die Sequenzen wurden mit einem Micro Vax Computer analysiert (Digital Equipment Corp.). Die verwendeten Programme sind im Sequence Analysis Software Package der Genetics Computer Group der Universität Wisconsin enthalten (University of Wisconsin Biotechnology Center, Madison, Wisconsin, USA).

2.1. Schwere Kette kodierende cDNA und flankierende Sequenzen

Restriktionsschnittstellen innerhalb der cDNA, welche den kodierenden Bereich der schweren Kette und angrenzende DNA-Bereiche bis einschließlich dem dG- bzw. dC-Homopolymerbereich enthält.

Die erste Zahl jeder Zeile gibt die Anzahl aller Restriktionsschnittstellen an, jede weitere Zahl gibt die Anzahl der Schnittstellen an der entsprechenden Stelle an.

	1	266	532	798	1063	1329	1595 bp
ENZYM	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----->						
Aat I	1.	1					
Acl I	6.	1		1		1	1 1 1
Afl III	1.			1			
Aju I	12.	1	1	11	11	1	1 11 11
Alw I	3.	1		2			
Alw NI	4.	1 1	1	1			
Aoc II	8.			1 1 11	1	1	1
Apa I	1.			1			
Apa LI	1.			1			
Apy I	9.	11 1	1 1 1		1	1	1
Aqu I	1.			1			
Ase I	1.	1					
Asn I	1.	1					
Asp HI	4.			1 1		1	1
Asu I	12.	11	1	1 12 1		1	1 1 1 1
Atu RI	9.	11 1	1 1 1		1	1	1
Ava I	1.			1			
Ava TI	6.	1		1		1	1 1 1
Avr I	1.			1			
Bam II	1.			1			
Ban TI	5.			11	1	1	1
Bbv I	3.	1		1 1			
Bbv TI	2.			1		1	
Bcl I	4.			1	1		2
Bgl I	2.			11			
Bsm AI	2.		1				1
Bsp I 2861	8.			1 1 11	1	1	1
Bsp HI	1.			1			
Bsp MI	3.	1		1		1	

ENZYME	1	266	532	798	1063	1329	1595 bp
	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----->						
BspNI	9.	11 1	1 1 1		1	1	1
BspRI	7.	1 1 1	1	111			
BsrI	14.	1 1 11 1	1 11 11	1	1	1 1	
BstI	1.		1				
BstGII	9.	11 1	1 1 1		1	1	1
BstNI	9.	11 1	1 1 1		1	1	1
BstYI	2.	1	1				
BsuRI	7.	1 1 1 1	1	111			
CcrI	1.			1			
CellI	1.						1
CfoI	1.				1		
CfrI3I	12.	11	1	1 12 1		1	1 1 1 1
CpfI	6.1	1		1	2 1		
CviJI	33.	212 1	111 2 121 1 11 2121	1 11	1	1 11 11	
CviQI	5.		1		1 11	1	
DdeI	15.	1	2 11	1 11	1 1	1	1 111
DpnI	6.1	1		1	2 1		
DraII	2.	1		1			
Eco47I	6.	1			1	1	1 1 1
Eco57I	2.	1				1	
EcoNI	1.		1				
EcoOI09I	2.	1		1			
EcoRII	9.	1 1 1	11	1	1	1	1
EcoT14I	1.			1			
EspI	1.						1
FinI	1.						1
Fnu4HI	3.		1	1 1			
FokI	9.1	1	1	1 1 11 1 1			
GsuI	1.	1					
HaeI	2.	1 1					
HaeII	1.				1		
HaeIII	7.	1 1 1	1	111			
HapII	4.			1	1		2
HgiAI	4.			1 1		1	1
HhaI	1.				1		
HincII	1.				1		
HindII	1.				1		
HinfI	5. 1		1	1		1	1
HinPII	1.				1		
HpaII	4.			1	1		2
HphI	4.		1 1	1			1
Ksp632I	2.	1				1	
MaeI	1.		1				
MaeII	2.				1	1	
MaeIII	9.	1	1 11 2	1		2	
MboI	6.1	1	1	2 1			
MboII	8.	1 1		2		2 1 1	
MflI	2.	1	1				
MnlI	22.	1	1 1 11 1 2 1	12 1 111 1 1 1 1 1		1	
MseI	1.	1					
MspI	4.			1	1		2
MvaI	9.	11 1	1 1 1		1	1	1
NciI	4.			1	1		2
NdeII	6.1	1	1	2 1			

ENZYM	1	266	532	798	1064	1329	1595 bp
NlaIII	9.		1		1 11	11 1	1 1
NlaIV	7.	1	1 11 1	1			1
NspI	2.		1		1		
NspII	8.			1 1 11 1	1 1		1
NspIII	1.			1			
NspIV	12.	11	1	1 12 1		1 1 1 1	
NspBII	2.			1	1		
NspHI	2.		1		1		
PaeR7I	1.			1			
PaiI	7.	1 1 1	1	111			
PleI	5. 1		1			1 1	
PspI	12.	11	1	1 12 1		1 1 1 1	
PssI	2.	1		1			
PstI	6. 1	1	1 1	1			1
PvuII	2.			1	1		
RsaI	5.		1		1 11	1	
RspXI	1.				1		
SacI	2					1	1
Sau3AI	6. 1	1		1	2 1		
Sau96I	12.	11	1	1 12 1		1 1 1 1	
ScaI	1.				1		
SclI	1.			1			
SerFI	13.	11 1		1 1 1 1	11	1 2 1	
SduI	8.			1 1 11 1	1 1		1
SdyI	12.	11	1	1 12 1		1 1 1 1	
SecI	5.	1 1	1	1			1
SexI	1.			1			
SfaNI	3. 1	1	1				
SinI	6.	1			1	1 1 1 1	
SsoII	13.	1 1 1		11 1 1	11	1 2 1	
SstI	2.					1	1
StuI	1.	1					
StyI	1.			1			
TaqI	2.			1	1		
TaqIIa	1.		1				
TaqIIfb	5.			1		1 11 1	
Tsp45I	7.		1 11 1	1	1	2	
TspEI	1.			1			
Tth111I	1.	1					
Tth1111I	1.			1			
TthRR8I	2.			1	1		
VspI	1.	1					
XhoI	1.			1			
XhoII	2. 1			1			

Restriktionsenzyme, für welche Erkennungssequenzen vorhanden sind:

AatI	AflI	AflIII	AluI	AluI	AlwNI	AocII	ApaI
ApalI	ApyI	AquI	AseI	AsnI	AspHI	AsuI	AtuBI
AvaI	AvaII	AvrI	BamHI	BanII	BbvI	BbvII	BcnI
BglI	BsmAI	Bsp1286I	BspHI	BspMI	BspNI	BspRI	BsrI

BstI	BstGII	BstNI	BstYI	BsuRI	CcrI	CelII	CfoI
Cfr13I	CpfI	CviJI	CviQI	DdeI	DpnI	DraII	Eco47I
Eco57I	EcoNI	EcoO109I	EcoRII	EcoT14I	EspI	FinI	Fnu4HI
FokI	GsuI	HaeI	HaeII	HaeIII	HapII	HgiAI	HhaI
HincII	HindII	HinfI	HinPII	HpaII	HphI	Ksp632I	MaeI
MaeII	MaeIII	MboI	MboII	MflI	MnlI	MseI	MspI
MvaI	NciI	NdeII	NlaIII	NlaIV	NspI	NspII	NspIII
NspIV	NspBII	NspHI	Paer7I	PaiI	PleI	PspI	PssI
PstI	PvuII	RsaI	RspXI	SacI	Sau3AI	Sau96I	ScaI
SciI	ScrFI	SduI	SdyI	SecI	SexI	SfaNI	SinI
SsoII	SstI	StuI	StyI	TaqI	TaqII	Tsp45I	TspEI
Tth111I	Tth111II	TthHB8I	VspI	XhoI	XhoII		

Restriktionsenzyme, für welche keine Erkennungssequenzen vorhanden sind:

AatII	AccI	AccII	AccIII	AcyI	AflII	AhaII	AhaIII
AocI	AosI	AosII	Asp700I	Asp718I	AsuII	AvaIII	AviII
AvrII	AxyI	BalI	BanI	BanIII	BbeI	BbiII	BceRI
BclI	BglII	BsmI	BspMII	BssHII	BstBI	BstEII	BstUI
BstXI	Bsu36I	CfrI	Cfr10I	ClaI	CvnI	DraI	DraIII
DsaI	EaeI	EagI	Eco31I	Eco47III	Eco52I	Eco78I	Eco81I
EcoO65I	EcoRI	EcoRV	EcoT22I	FnuDII	FspI	FspII	GdiII
HgaI	HgiDI	HgiEII	HindIII	HpaI	KpnI	MluI	MmeI
MroI	MvnI	NaeI	NarI	NcoI	NdeI	NheI	NotI
NruI	NsiI	NspV	NunII	OxaNI	PflMI	PmaCI	PpuMI
PvuI	RsrII	SacII	SalI	SauI	SfiI	SmaI	SnaBI
SpeI	SphI	SplI	SspI	SstII	ThaI	XbaI	XcaI
XcyI	XmaI	XmaIII	XmnI	XorII			

2.2. Leichte Kette kodierende cDNA und flankierende Sequenzen

Restriktionsschnittstellen innerhalb der cDNA, welche den kodierenden Bereich der leichten Kette und angrenzende DNA-Bereiche bis einschließlich dem dG- bzw. dC-Homopolymerbereich enthält.

Die erste Zahl jeder Zeile gibt die Anzahl aller Restriktionsschnittstellen an, jede weitere Zahl gibt die Anzahl der Schnittstellen an der entsprechenden Stelle an.

	1	164	328	493	657	821	985 bp
ENZYM	----->						
AcyI	2.				1	1	
AflII	2.		1			1	
AflIII	1.	1					
AhaII	2.				1	1	
AluI	6.	1		1		1 1 2	
AlwI	1.		1				
AlwNI	1.	1					
AocII	1.						1
AosII	2.				1	1	
ApyI	5.	1 1 1	1				1
AseI	1.						1
AsnI	1.						1
Asp700I	1.			1			
Asp718I	1.	1					
AspHI	1.						1
AsuI	3.	1	1			1	
AtuRI	5.	1 1 1	1				1
AvaII	2.		1			1	
BanI	3.	1		1 1			
BclII	2.				1	1	
BbvI	5.	2 1		1	1		
BbvII	1.		1				
BclI	1.				1		
BsmAI	4.	1 1				1 1	
Bsp1286I	1.						1
BspNI	5.	1 1 1	1				1
BspRI	2.	1			1		
BsrI	3.	1 1		1			
BstGII	5.	1 1 1	1				1
BstNI	5.	1 1 1	1				1
BstYI	1.		1				
BsuRI	2.	1			1		
CfrI3I	3.	1	1			1	
CpfI	4.		1 1 1		1		
CviJJ	13.	1 1 1 1	1 1 1 1			2 1 2	1
CviOI	2.	1	1				
DdeI	3.			1		1 1	
DpnI	4.		1 1 1		1		
DraII	2.		1			1	
Eco47I	2.		1			1	

ENZYM	1	164	328	493	657	821	985 bp
	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----->						
Eco57I	1.		1				
EcoO109I	2.		1			1	
EcoRII	5.	1	1	1			1
EcoT14I	1.				1		
FinI	4.1	1	1 1				
Fnu4HI	5.	2	1	1	1		
FokI	4.	1	1	1		1	
GsuI	1.			1			
HaeI	1.				1		
HaeIII	2.	1			1		
HgaI	2.				1	1	
HgiAI	1.						1
HgiDI	2.				1	1	
HincII	2.			1	1		
HindII	2.			1	1		
HinfI	4.	1	1	1			1
HpaI	1.			1			
HphI	2.		1		1		
KpnI	1.		1				
MaeI	1.		1				
MaeII	3.	1		1	1		
MaeIII	2.	1 1					
MboI	4.		1 11		1		
MboII	5.			11	1	1	
MflI	1.		1				
MmeI	1.				1		
MnlI	13.	1		1 11	1 1	1	123
MseI	2.			1			1
MvaI	5.	1	1	1			1
NdeII	4.		1 11		1		
NlaIII	2.				1		1
NlaIV	6.		1 2	1 1		1	
NspII	1.						1
NspIV	3.	1	1			1	
PalI	2.	1			1		
PleI	2.		1				1
PpuMI	2.		1			1	
PspI	3.	1	1			1	
PssI	2.		1			1	
PstI	2.1						1
RsaI	2.	1	1				
Sau3AI	4.		1 11		1		
Sau96I	3.	1	1			1	
ScrFI	5.	1	1	1			1
SduI	1.						1
SdyI	3.	1	1			1	
SecI	4.	1	1	1	1		
SfaNI	2.		1	1			
SinI	2.		1			1	
SsoII	5.	1	1	1			1
SspI	2.						11
StyI	1.				1		
TaqIIb	1.					1	
Tsp45I	2.	1 1					

ENZYM	1	164	328	493	657	821	985 bp
	+-----+-----+-----+-----+-----+-----+----->						
Tth1111I	1.			1			
VspI	1.						1
XhoII	1.		1				
XmnI	1.			1			

Restriktionsenzyme, für welche Erkennungssequenzen vorhanden sind:

AcyI	AflI	AflIII	AhaII	AluI	AlwI	AlwNI	AocII
AosII	ApyI	AseI	AsnI	Asp700I	Asp718I	AspHI	AsuI
AtuBI	AvaII	BanI	BbiII	BbvI	BbvII	BclI	BsmAI
Bsp1286I	BspNI	BspRI	BsrI	BstGII	BstNI	BstYI	BsuRI
Cfr13I	CpfI	CviJI	CviQI	DdeI	DpnI	DraII	Eco47I
Eco57I	EcoO109I	EcoRII	EcoT14I	FinI	Fnu4HI	FokI	GsuI
HaeI	HaeIII	HgaI	HgiAI	HgiDI	HincII	HindII	HinfI
HpaI	HphI	KpnI	MaeI	MaeII	MaeIII	MboI	MboII
MflI	MmeI	MnlI	MseI	MvaI	NdeII	NlaIII	NlaIV
NspII	NspIV	PalI	PleI	PpuMI	PspI	PssI	PstI
RsaI	Sau3AI	Sau96I	ScrFI	SduI	SdyI	SecI	SfaNI
SinI	SsoII	SspI	StyI	TaqII	Tsp45I	Tth1111I	VspI
XhoII	XmnI						

Restriktionsenzyme, für welche keine Erkennungssequenzen vorhanden sind:

AatI	AatII	AccI	AccII	AccIII	AflII	AhaIII	AocI
AosI	ApaI	ApalI	AquI	AsuII	AvaI	AvaIII	AviII
AvrI	AvrII	AxyI	BalI	BamHI	BanII	BanIII	BbeI
BceRI	BcnI	BglI	BglII	BsmI	BspHI	BspMI	BspMII
BssHII	BstI	BstBI	BstEII	BstUI	BstXI	Bsu36I	CcrI
CelII	CfoI	CfrI	Cfr10I	Clal	CvnI	DraI	DraIII
DsaI	EaeI	EagI	Eco31I	Eco47III	Eco52I	Eco78I	Eco81I
EcoNI	Eco65I	EcoRI	EcoRV	EcoT22I	EspI	FnuDII	FspI
FspII	GdiII	HaeII	HapII	HgiEII	HhaI	HindIII	HinPI
HpaII	Ksp632I	MluI	MroI	MspI	MvnI	NaeI	NarI
NciI	NcoI	NdeI	NheI	NotI	NruI	NsiI	NspI
NspIII	NspV	NspBII	NspHI	NunII	OxaNI	Pae7I	PflMI
PmaCI	PvuI	PvuII	RspXI	RsrII	SacI	SacII	SalI
SauI	ScaI	SciI	SexI	SfiI	SmaI	SnaBI	SpeI
SphI	SpI	SstI	SstII	StuI	TaqI	ThaI	TspEI
Tth111I	TthHB8I	XbaI	XcaI	XcyI	XhoI	XmaI	XmaIII
XorII							

Adams, B.G.: Induction of galactokinase in *Saccharomyces cerevisiae*: Kinetics of induction and glucose effects. *J. Bact.* **111** (1972) 308-315.

Adams, J.M.: The organization and expression of immunoglobulin genes. *Immunology Today* **7** (1980) 10-17.

Baldari, C., Murray, J.A.H., Ghiara, P., Cesareni, G. and Galeotti, C.L.: A novel leader peptide which allows efficient secretion of a fragment of human interleukin 18 in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **6** (1987) 229-234.

Baron, D., Hartlaub, U.: Humane monoklonale Antikörper. Theorie - Herstellung - Anwendung. Gustav Fischer, Stuttgart - New York (1987).

Beckert, A.: Passive Immunisierung gegen *Pseudomonas aeruginosa* mit monoklonalen Antikörpern. Doktorarbeit (1987).

Beggs, J.D., Van Den Berg, J., Van Ooyen, A. and Weissman, C.: Abnormal expression of chromosomal rabbit β -globin gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **283** (1980) 835-840.

Bennetzen, J.L. and Hall, B.D.: Codon selection in yeast. *J. Biol. Chem.* **257** (1982) 3026-3031.

Bodey, G.P., Bolivar, R., Fainstein, V., Jadeja, L.: Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Infec. D.* **5** (1983) 279-313.

Böhm, D.: Erfahrungen mit einem Pseudomonas-Immunglobulin bei beatmeten Patienten mit Pseudomonas-Pneumonie auf einer chirurgischen Intensivstation. *Infection* **15** (1987) 73-75.

Bostian, K.A., Elliott, Q., Bussey, H., Burn, V., Smith, A., and Tipper, D.J.: Sequence of the preprotoxin dsRNA gene of type I killer yeast: Multiple processing events produce a two component toxin. *Cell* **36** (1984) 229-234.

Brack, C., Hirama, M., Lenhard-Schuller, R. and Tonegawa, S.: A complete immunoglobulin gene is created by somatic recombination. *Cell* **15** (1978) 1-14.

Brandis, H., Otte, H.J.: Lehrbuch der medizinischen Mikrobiologie. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York (1984).

Broach, J.R.: The yeast plasmid 2μ circle. *Cell* **28** (1982) 203-204.

Buckel, P., Hübner-Parajsz, C., Mattes, R., Lenz, H., Haug, H. and Beaucamp, K.: Cloning and nucleotide sequence of heavy- and light -chain cDNAs from a creatine-kinase-specific monoclonal antibody. *Gene* **51** (1987) 13-19.

Cabezón, T., De Wilde, M., Herion, P., Loriau, R. and Bollen, A.: Expression of human α_1 -antitrypsin cDNA in the yeast *S. cerevisiae*. *PNAS* **81** (1984) 6594-6598.

Chen, E. Y. and Seeburg, P.: Supercoil sequencing: A fast and simple method for sequencing plasmid DNA. *DNA* **4** (1985) 165-170.

Choo, K.-B., Wu, S.-M., Hung, L. and Lee, H.-H.: Effect of vector type, host strains and transcription terminator on heterologous gene expression in yeast. *Bioc. Biop. R.* **140** (1986) 602 - 608.

Class, I., Junginger, W., Klöss, Th.: Einsatz von *Pseudomonas*-Immunglobulin bei beatmeten Patienten einer interdisziplinären chirurgischen Intensivstation. *Infection* **15** (1987) 76-79.

Collins, M.S., Hector, R.F., Roby, R.E., Edwards, A.A., Ladehoff, D.K., Dorsey, J.H.: Prophylaxe gramnegativer und grampositiver Infektionen mit drei intravenösen Immunglobulin-Präparaten und Therapie der experimentellen polymikrobiellen Verbrennungsepsis mit intravenösen *Pseudomonas*-Immunglobulin G und Ciprofloxacin im Tiermodell. *Infection* **15** (1987) 60-68.

Cooper, T.G.: Transport in *S. cerevisiae*. In Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (Eds.): *The molecular biology of the yeast saccharomyces. Metabolism and gene expression.* Cold Spring Harbour Laboratory (1982) pp 399-461.

Cross, A.S.: Evolving epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* infections. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **4** (1985) 156-159.

Cryz, S. J. jr., Furer, E., Sadoff, J.C. and Germanier, R.: *Pseudomonas aeruginosa* immunotype 5 polysaccharide-toxin A conjugate vaccine. *Infect. Immun.* **52** (1986) 161-165.

Derynck, R., Singh, A. and Goeddel, D.V.: Expression of the human interferon- α cDNA in yeast. *Nucl. Acids Res.* **11** (1983) 1819-1837.

Dobson, M.J., Tuite, M.F., Roberts, N.A., Kingsman, A.J., Kingsman, S.M., Perkins, R.E., Conroy, S.C., Dunbar, B. and Fothergill, L.A.: Conservation of high efficiency promoter sequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucl. Acids Res.* **10** (1982) 2625-2637.

Doggett, R. G. (Ed.): *Pseudomonas aeruginosa. Clinical manifestations of infection and current therapy.* Acad. Press, NY. (1979).

Domdey, H., Apostol, B., Lin, R.-J., Newman, A., Brody, E. and Abelson, J.: Lariat structures are in vivo intermediates in yeast pre-mRNA splicing. *Cell* **39** (1984) 611-621.

Duchêne, M., Schweizer, A., Lottspeich, F., Krauss, G., Marget, M., Vogel, K., von Specht, B.-U. and Domdey, H.: Sequence and transcriptional start site of the *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane porin protein F gene. *J. Bact.* **170** (1988) 155-162.

Early, P., Huang, H., Davis, M., Calame, K. and Hood, L.: An immunoglobulin heavy chain variable region gene is generated from three segments of DNA: V_H, D and J_H. *Cell* **19** (1980) 981-992.

Eckhardt, A., Heiss, M., Ehret, W., Permanetter, W. and von Specht, B.-U.: Evaluation of protective monoclonal antibodies against *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane protein I by C1q binding assay. (1988) Submitted.

Edens, L., Bom, I., Ledeboer, A.M., Maat, J., Toonen, M.Y., Visser, C. and Verrips, C.T.: Synthesis and processing of the plant protein thaumatin in yeast. *Cell* **37** (1984) 629-633.

Emr, S.D., Bankaitis, V.A., Garrett, J.M. and Douglas, M.G.: Gene fusions to study intracellular protein traffic and organelle assembly in yeast. In M.-J. Gething (Ed.): Protein transport and secretion. Current communications in molecular biology. Cold Spring Harbour Laboratory. (1985) pp 184-189.

Feinberg, A.P., Vogelstein, B.: A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Analytical Biochemistry* **137** (1984) 266-267.

Fling, S.P. and Gregerson, D.S.: Peptide and protein molecular weight determination by electrophoresis using a high molarity tris buffer system without urea. *Anal. Biochem.* **155** (1986) 83-88.

Gordon, G.C. and McMaster, G.K.: The analysis of nucleic acids in gels using glyoxal and acridine orange. *Methods Enzymol.* **65** (1980) 380-391.

Gottlieb, P.D.: Immunoglobulin genes. *Molecular Immunol.* **17** (1980) 1423-1435.

Graybill, J.R., Marshall, L.W., Charache, P., Wallace, C.K., Melvin, V.B.: Nosocomial pneumonia. A continuing major problem. *Am. R. Resp. D.* **108** (1973) 1130-1140.

Guarente, L. and Mason, T.: Heme regulates transcription of the CYC 1 gene in *Saccharomyces cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* **32** (1983) 1279-1286.

Guthrie, C. and Abelson, J.: Organization and expression of tRNA genes in *S. cerevisiae*. In Strathern, J.N., Jones, E.W. and Broach, J.R. (Eds.): The molecular biology of the yeast *saccharomyces*. Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbour Laboratory (1982) pp 487-528.

Hamlyn, P.H., Gait, M.J. and Milstein, C.: Complete sequence of an immunoglobulin mRNA using specific priming and the dideoxynucleotide method of RNA sequencing. *Nucl. Acids Res.* **9** (1981) 4485-4494.

Hanahan, D.: Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166** (1983) 557-580.

Hancock, R.E.W.: Intrinsic antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Antimicrob. Chemother.* **18** (1986) 653-659.

Hartley, J.L. and Donelson, J.E.: Nucleotide sequence of the yeast plasmid. *Nature* **286** (1980) 860-865.

Hilleman, M.R.: Yeast recombinant hepatitis B vaccine. *Infection* **15** (1987) 3-7.

Homma, J.Y.: Perspectives on the development of a new vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. In Easman, C.S.F., Jeljaszewicz (Eds.): *Medical microbiology*, Vol. I, Academic Press Inc., NY (1982).

Honjo, T.: Immunoglobulin genes. *Ann. Rev. Immunol.* **1** (1983) 499-528.

Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A.: Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *J. Bact.* **153** (1983) 163-168.

Ikemura, T.: Correlation between the abundance of yeast transfer RNAs and the occurrence of the respective codons in protein genes. *L. Mol. Biol.* **158** (1982) 573-597.

Johnston, M. and Davis R.W.: Sequences that regulate the divergent *GALI-GAL10* promoter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. B.* **4** (1984) 1440-1448.

Jones, R.J., Roe, E.A. and Gupta, J.L.: Controlled trials of a polyvalent pseudomonas vaccine in burns. *The Lancet* Nov. 10 (1979) 977-983.

Kabat, E.A., Tai Te Wu, Reid-Miller, M., Perry, H.M. and Gottesman, K.S.: Sequences of proteins of immunological interest. 4th Ed. U.S. Department of health and human services. Public health service national institutes of health. (1987).

Kingsman, S.M., Kingsman, A.J., Dobson, M.J., Mellor, J. and Roberts, N.A.: Heterologous gene expression in *S. cerevisiae*. In Russel, G.E. (Ed.): *Biotechnology & genetic engineering reviews*, Vol 3, Intercept, Ponteland, Newcastle upon Tyne (1985) pp 377-416.

Kingsman, S.M., Kingsman, A.J. and Mellor, J.: The production of mammalian proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Tibtech* **5** (1987) 53-57.

Klein, J.: Immunology. The science of self-nonsel self discrimination. John Wiley and Sons, New York - Chichester - Brisbane - Toronto - Singapore (1982).

Knippers, R.: Molekulare Genetik. Georg Thieme, Stuttgart - New York (1982).

Kurosawa, Y. and Tonegawa, S.: Organization, structure, and assembly of immunoglobulin heavy chain diversity DNA segments. *J. Exp. Med.* **155** (1982) 201-218.

Kurosawa, Y., v. Boehmer, H., Haas, W., Sakano, H., Trauneker, A. and Tonegawa, S.: Identification of D segments of immunoglobulin heavy-chain genes and their rearrangement in T lymphocytes. *Nature* **290** (1981) 565-570.

Kyhse-Andersen, J.: Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J. Bioch. Bio.* **10** (1984) 203-209.

Lam, J.S., Mutharia, L.M., Hancock R.E.W.: Application of monocloal antibodies to the study of the surface antigens in *Pseudomonas aeruginosa*. In Macario, A.J.L., Macario, E.C. de (Eds.): Monoclonal antibodies against bacteria. Vol. II. Academic Press, Orlando, Fl (1985) pp 143-157.

Langford, C., Nellen, N., Niessing, J. and Gallwitz, D.: Yeast is unable to excise foreign intervening sequences from hybrid gene transcripts. *Cell* **33** (1983) 519-524.

Lanyi, B., Bergan, T.: Serological characterization of *Pseudomonas aeruginosa*. In: Methods in Microbiology, Vol. 10, Academic Press, London (1978).

Lawbury, E.J.L.: Contamination of citrimide and other fluids with *Pseudomonas pyocyania*. *Br. J. intern. Med.* **8** (1951) 22-25.

Leder, P.: The genetics of antibody diversity. *Scientific American* **246** (1982) 72-83.

Leder, P., Max, E.E., Seidman, J.G., Kwan, S.-P., Scharff, M., Nau, M. and Norman, B.: Recombination events that activate, diversify, and delete immunoglobulin genes. Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol. **45** (1980) 859-865.

Liu, F.-T., Albrandt, K.A., Bry, C.G. and Ishizaka, T.: Expression of a biologically active fragment of human IgE e chain in *Escherichia coli*. *PNAS* **81** (1984) 5369-5373.

MacIntyre, S., Lucken, R. and Owen, P.: Smooth lipopolysaccharide is the major protective antigen for mice in the surface extract from IATS serotype 6 contributing to the polyvalent *Pseudomonas aeruginosa* vaccine PEV. *Infect. Immun.* **52** (1986) 76-84.

Maizels, N., and Bothwell, A.: The T-cell independent immune response to the hapten NP uses a large repertoire of heavy chain genes. *Cell* **43** (1985) 715-720.

Maniatis, T., Fritsch and E., Sambrook, J.: Molecular cloning. A laboratory manual. CSH, NY (1982).

Margolies, M.N., Marshak-Rothstein, A. and Gefer, M.L.: Structural diversity among anti-*p*-azophenylarsenate monoclonal antibodies from A/J mice: Comparison of Id⁻ and Id⁺ sequences. *Mol. Immunol.* **18** (1981) 1065-1077.

Martinez, D. and Callahan III, L.T.: Prophylaxis of *Pseudomonas aeruginosa* infections in leukopenic mice by a combination of active and passive immunization. *Eur. J. Clin. Microbiol.* **4** (1985) 186-189.

Matthews-Greer, J. M., and H. E. Gilleland, jr.: Outer membrane protein F (porin) preparation of *Pseudomonas aeruginosa* as a protective vaccine against heterologous immunotype strains in a burned mouse model. *J. Infect. Dis.* **155** (1987) 1282-1291.

Maxam, A.M. and Gilbert, W.: Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* **65** (1980) 499-560.

McManus, W.F., Goodwin, C.W., Mason, A.D.jr., Pruitt, B.A.: Burn wound infection. *J. Trauma* **21** (1981) 753-756.

Mellor, J., Dobson, M.J., Roberts, N.A., Tuite, M.F., Emtage, J.S., White, S., Lowe, P.A., Patel, T., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M.: Efficient synthesis of enzymatically active calf chymosin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **24** (1983) 1-14.

Mellor, J., Dobson, M.J., Roberts, N.A., Kingsman, A.J. and Kingsman, S.M.: Factors affecting heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **33** (1985) 215-226.

Messing, J.: New M13 vectors for cloning. In Wu, R., Grossman, Moldave, K. (Eds.). *Methods Enzymol.* **101** (1983) 20-78.

Meyer, D.L., Krause, E. and Dobberstein, B.: Secretory protein translocation across membranes - The role of the "docking protein". *Nature* **297** (1982) 647-650.

Mizuno, T., Kageyama, M.: Isolation and characterization of a major outer membrane protein of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Biochem.* **85** (1979) 115-122.

Mutharia, L.M., Nicas, T.I. and Hancock, R.E.W.: Outer membrane proteins of *Pseudomonas aeruginosa* serotype strains. *J. Infect. Dis.* **146** (1982) 770-779.

Newman, A.J., Ogden, R.C. and Abelson, J.: tRNA gene transcription in yeast: effects of specified base substitutions in the intragenic promoter. *Cell* **35** (1983) 117-125.

Newman, A.J., Lin, R.-J., Cheng, S.-C., and Abelson, J.: Molecular consequences of specific intron mutations on yeast mRNA splicing in vivo and in vitro. *Cell* **42** (1985) 335-344.

Nose, M., Wigzell, H.: Biological significance of carbohydrate chains on monoclonal antibodies. *PNAS* **80** (1983) 6632-6636.

Oshima, Y.: Regulatory circuits for gene expression: The metabolism of galactose and phosphate. In Strathern, J.W., Jones, E.W. and Broach, J.R. (Eds.): *The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*, metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbour Laboratory (1982) pp 159-180.

Pavlouskis, O.R., Wretling, B.: Assessment of protease (elastase) as a *Pseudomonas aeruginosa* virulence factor in experimental mouse burn infections. *Infect. Immun.* **18** (1979) 181-187.

Pennington, J.E.: Immunotherapy of *Pseudomonas aeruginosa* infection. In Doggett, R.G. (Ed.) *Pseudomonas aeruginosa*. Clinical manifestations of infection and current therapy. Academic Press, NY (1979) pp 191-217.

Perlman, D. and Halvorson, H.O.: A putative Signal peptidase recognition site and sequence in eukaryotic and prokaryotic signal peptides. *J. Mol. Biol.* **167** (1983) pp 391-409.

Pollack, M., Tyler, N.S., Callahan, L.T.: Exotoxin production by clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* **15** (1977) 776-780.

Potter, M., Newell, J.B., Rudikoff, S. and Haber, E.: Classification of mouse VK groups based on the partial amino acid sequence to the first invariant tryptophan: Impact of 14 new sequences from IgG myeloma proteins. *Molec. Immunol.* **19** (1982) 1619-1630.

Pruitt, B.A.jr., Colonel, M.C., McManus, A.T.: Opportunistic infections in severely burned patients. *Am. J. Med.* **76** (1984) 146-154.

Radler, F. und Pfeiffer, P.: Das Killerphänomen bei Hefen. *Forum Mikrobiologie* **4** (1986) 198-208.

Reynolds, H.Y., Fick, R.B.: *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infections (emphasizing noscomial pneumonia in cystic fibrosis). In Sabath, L.D. (Ed.): *Pseudomonas aeruginosa* international symposium. Huber, Bern (1980).

Roggenkamp, R., Dargatz, H. and Hollenberg, C.P.: Precursor of β -lactamase is enzymatically inactive. *J. Biol. Chem.* **260** (1985) 1508-1512.

Roitt, I., Brostoff, J. and Male, D.K.: *Immunology*. Gower Medical Publishing. London - New York. (1985).

Rudikoff, S., Satow, Y., Padlan, E., Davies, D. and Potter, M.: Kappa chain structure from a crystallized murine FAB': Role of joining segment in hapten binding. *Mol. Immunol.* **18** (1981) 705-711.

Sabatini, D.D., Kreibich, G., Morimoto, T. and Adesnik, M.: Mechanisms for the incorporation of proteins in membranes and organelles. *J. Cell Biol.* **92** (1982) 1-22.

Sakano, H., Hüppi, K., Heinrich, G. and Tonegawa, S.: Sequences at the somatic recombination sites of immunoglobulin light chain genes. *Nature* **280** (1979) 288-294.

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A.R.: DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74** (1977) 5463-5467.

Schekman, R. and Novick, P.: The secretory process and yeast cell surface assembly. In Strathern, J., Jones, F.W. and Broach, J.R. (Eds.): *The molecular biology of the yeast saccharomyces*, Vol 2: Metabolism and gene expression. Cold Spring Harbour Laboratory, New York (1982) pp 361-398.

Schreier, P.H., Bothwell, A.L.M., Müller-Hill, B. and Baltimore, D.: Multiple differences between the nucleic acid sequences of the IgG2a^a and IgG2a^b alleles of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **78** (1981) 4495-4499.

Schultz, L.D., Hofmann, K.J., Mylin, L.M., Montgomery, D.L., Ellis, R.W. and Hopper, J.E.: Regulated overproduction of the *GAL4* gene product greatly increases expression from galactose-inducible promoters on multi-copy expression vectors in yeast. *Gene* **61** (1987) 123-133.

Seltmann, G.: *Die bakterielle Zellwand*. Verlag Gustav Fischer, Stuttgart (1982).

Shimada, H., Fukasawa, T.: Controlled transcription of the yeast regulatory gene *GAL80*. *Gene* **39** (1985) 1-9.

Struhl, K.: Deletion mapping a eukaryotic promoter. *PNAS* **78** (1981) 4451-4465.

Sutcliffe, J.G.: Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322. *Cold Spring Harbour Symp. Quant. Biol.* **43** (1979) 77.

Thill, G.P., Kramer, R.A., Turner, K.J. and Bostian, K.A.: Comparative analysis of the 5'-end regions of two repressible acid phosphatase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. B.* **3** (1983) 570-579.

Thomas, P.S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **77** (1980) 5201-5205.

Tonegawa, S., Sakano, H., Maki, R., Traunecker, A., Heinrich, G., Roeder, W. and Kurosawa, Y.: Somatic reorganization of immunoglobulin genes during lymphocyte differentiation. CSH Symp. Quant. Biol. **45** (1981) 839-858.

von Specht, B.U., Strigl, G., Ehret, W. and Brendel, W.: Protective effect of an outer membrane vaccine against *Pseudomonas aeruginosa* infection. Infection **15** (1987) 408-412.

von Specht, B.U., Strigl, G., Ehret, W. and Brendel, W.: Aktive Immunisierung gegen 11 verschiedene Serotypen von *Pseudomonas aeruginosa* mit einer Zellmembran Vaccine vom Serotyp 12. In Stelzner, F. (Ed.): Chirurgisches Forum '85 f. experim. u. klinische Forschung. Springer, Berlin, Heidelberg (1985) 215-218.

Walter, P. and Blobel, G.: Translocation of proteins across the endoplasmatic reticulum. II. Signalrecognition particle (SRP) mediates selective binding to microsomal membranes of *in vitro* assembled polysomes synthesizing secretory protein. J. Cell Biol. **91** (1981) 551-556.

Weischet, W.O., Glotov, B.O., Schnell, H. and Zachau, H.G.: Differences in the nuclease sensitivity between the two alleles of the immunoglobulin kappa light chain genes in mouse liver and myeloma nuclei. Nucl. Acids Res. **10** (1982) 3627-3645.

Winnacker, E.-L.: Gene und Klone. Eine Einführung in die Gentechnologie. Verlag Chemie. Weinheim. (1984).

Wood, C., Boss, M.A., Kenten, J.H., Calvert, J.E., Roberts, N.A. and Emtage, S.: The synthesis and *in vivo* assembly of functional antibodies in yeast. Nature **314** (1985) 446-449.

Woods, D.: Oligonucleotide screening of cDNA libraries. Focus **6** (3) (1984) 1-3.

Yanish-Perron, C., Vieira, J. and Messing, J.: Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. Gene **33** (1985) 103-119.

Zak, O.: Antibiotics and *Pseudomonas aeruginosa*. In Sabath, L.D. (Ed.): *Pseudomonas aeruginosa* international symposium. Huber, Bern (1980) pp 133-159.

LEBENS LAUF

Persönliche Daten:

Familienname	Marget
Vornamen	Matthias, Rudolf
Geburtsort	Freiburg im Breisgau
Geburtsdatum	13. Mai 1955
Wohnort	München

Ausbildung:

Grundschule	1962 - 1966 in Tübingen
-------------	-------------------------

Gymnasium	1966 - 1977
-----------	-------------

Abitur	Juli 1977 in Hohenschwangau
--------	-----------------------------

Hochschulen	Im Wintersemester 1977/78 an der Ludwig-Maximilians-Universität München im Fach Geologie-Paläontologie immatrikuliert
-------------	---

Sommersemester 1978: Arbeit in einem Labor
für klinische Mikrobiologie der
Universität von Chicago/Illinois (USA)

Wintersemester 1978 bis einschließlich
Sommersemester 1984 Biologiestudium an der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Hauptstudium in den Fächern:

Pflanzenphysiologie
Genetik
Biochemie
Hauptfach Mikrobiologie
Diplomarbeit im Fach Mikrobiologie

Diplomarbeit	August 1983 bis Oktober 1984 am Institut für Genetik und Mikrobiologie der Julius-Maximilians- Universität Würzburg bei Herrn Prof. Werner Goebel unter Anleitung von Herrn Dr. Jörg Hacker
--------------	---

Thema der Diplomarbeit:

Charakterisierung einer Mannoseresistenten
Hämagglutinationsdeterminante von
uropathogenen *Escherichia coli*

Promotion

November 1984 bis November 1987 am
Laboratorium für molekulare Biologie -
Genzentrum - der Ludwig-Maximilians-
Universität München bei Herrn
Prof. Ernst-Ludwig Winnacker unter
Anleitung von Herrn
Dr. Horst Domdey

Thema der Promotion:

Synthese und Klonierung der cDNA eines für
Pseudomonas aeruginosa spezifischen
monoklonalen Antikörpers und
Charakterisierung seiner Expression in
Saccharomyces cerevisiae

München, den 16.4.1988



